INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
CHAIRE D'AGRONOMIE
THIVERVAL-GRIGNON
78850
MINISTERE DE L'AGRICULTURE

annales de l'amélioration des plantes

Trimestriel

1980

Vol. 30 - N° 3

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

LA 8 30 (3), 229-344 (1980)

AP30.3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS, Tél. : 551-41-09.

Directeur général : J. POLY

Annales agronomiques.

— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— P. CHARTIER, Chef du Département de Bioclimatologie, C.N.R.A., 78000 Versailles.
— J. MAMY, Chef du Département de Science du Sol, C.N.R.A., 78000 Versailles.

Annales de l'Amélioration des Plantes.

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., 11, rue Jean-Nicot 75007 Paris.

Annales de Phytopathologie.

— A. COLÉNO, Chef du Département de Pathologie végétale, I.N.A., Paris Grignon, 16, rue Claude-Bernard, Paris Cedex 75231.

Annales de Zootechnie.

— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas.

Annales de Technologie agricole.

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C.E.R.D.I.A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas.
— A. BOURDET, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A., 16, rue N.-Fortin, 75013 Paris.

Annales des Sciences forestières.

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C.N.R.F., 54280 Seichamps.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production. C.N.R.F., 54280 Seichamps.

Annales de Génétique et de Sélection animale.

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle, C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas.
— F. GROSCLAUDE, Chef du Département de Génétique animale, C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas.

Apidologie (Revue franco-allemande, co-édition I.N.R.A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures-sur-Yvette.

Annales de Recherches vétérinaires.

— J. ASSO, Station de Virologie, Immunologie, Route de Thiverval 78850 Thiverval-Grignon.

Reproduction, Nutrition, Développement. Administration et secrétariat de la Rédaction à l'adresse suivante : C.N.R.Z., 78350 JOUY-EN-JOSAS.

— L. GUÉGUEN.
— G. PÉTRISSANT.
— Ch. THIBAULT.

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I.N.R.A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-223

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
CHAIRE D'AGRONOMIE
THIVERVAL-GRIGNON
78850
MINISTERE DE L'AGRICULTURE

annales de l'amélioration des plantes

Trimestriel

1980

Vol. 30 - N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 229-251.

Analyse des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle

I. — Etude des parents et des hybrides de première génération (F_1) entre un écotype de *Pennisetum mollissimum* Hochst (forme spontanée) et différentes formes cultivées de *Pennisetum americanum* (L.), Leeke.

J. BELLIARD, É. NGUYEN VAN et J. PERNÈS

Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement des Plantes (G.P.D.P.) Service de Génétique, C.N.R.S. 91190 Gif-sur-Yvette France

Résumé

Cet article rapporte l'étude de 6 lignées de Mil cultivé, *Pennisetum americanum* (L.) Leeke et de leurs hybrides avec une même plante d'un écotype de Mil spontané, *Pennisetum mollissimum* Hochst.

L'analyse de 26 caractères quantitatifs et 15 caractères qualitatifs permet d'obtenir une description précise des formes cultivées, des formes spontanées et des hybrides F_1 issus du croisement. Aucune barrière reproductive n'existe entre la forme spontanée et les formes cultivées au niveau F_1. Une analyse de régression à parent constant permet de donner quelques conclusions quant à l'hérédité des différents caractères étudiés.

Introduction

En Afrique, la section *Pennicillaria* du genre *Pennisetum* comprend un certain nombre d'espèces parmi lesquelles le Mil, *Pennisetum americanum* (L.) Leeke (ou *P. typhoideum* (L.) Rich.) est représenté par des cultivars très variés entre lesquels aucune barrière reproductive n'a été signalée.

Parmi les formes spontanées on peut citer l'espèce *Pennisetum violaceum* (L.), assez inféodée aux lieux d'habitation et aux pourtours des champs et *Pennisetum mollissimum* (L.) que l'on peut aussi rencontrer en dehors des zones de culture du Mil à chandelle. Ces deux formes spontanées n'existent qu'en Afrique qui peut être considérée comme continent d'origine du Mil (BILQUEZ, 1969; BRUNKEN *et al.*,

1977). Toutes ces formes sont diploïdes ($2n = 14$) et allogames; elles possèdent en commun un critère d'identification taxonomique qui est une petite touffe de poils au sommet des étamines. Une étude génétique est entreprise par notre laboratoire pour définir les possibilités d'échanges géniques entre formes spontanées et formes cultivées. Les résultats seront présentés dans une série d'articles. Dans le premier, nous analyserons des hybrides F_1 réalisés entre une plante d'un écotype de *Pennisetum mollissimum* et une gamme de formes cultivées typiques très différentes (*).

Nous étudierons la viabilité de ces hybrides F_1, leur aspect et leur fertilité. Le deuxième article analysera quelques familles de la génération F_2. Le troisième article intègrera aux observations précédentes les données acquises par l'étude électrophorétique d'isozymes sur les mêmes familles.

Matériel et méthodes

1. — *Les plantes*

Les formes cultivées utilisées dans cette étude nous ont été fournies par l'O.R.S.T.O.M., Bondy (France). Ces cultivars ont été entretenus et multipliés sous forme de lignées par autofécondation dans les serres de Gif-sur-Yvette.

A. *Les formes cultivées de* Pennisetum americanum.

a) « Ligui » : (L) : lignée naine issue d'un cultivar originaire du Tchad.

b) « 23 DB » : (DB) : lignée naine sélectionnée à Tifton, en Georgie (U.S.A.).

c) « Massue » : (Ma) : lignée présumée issue d'un cultivar d'oasis mauritanien.

d) « Sanio » : (Sa) : lignée en cours de fixation, issue d'un cultivar Sénégalais tardif de la région de Casamance.

e) « J 104 » : (J) : lignée sélectionnée aux Indes.

f) « Tiotandé » : (T) : lignée en cours de fixation issue d'un cultivar sénégalais de décrue de la région du fleuve Sénégal.

B. *Les formes spontanées.*

Les formes spontanées utilisées dans cette étude ont été récoltées sous forme de graines. Elles ont subi une génération d'autofécondation dans nos serres avant la mise en expérience.

(*) Les données, tant archéologiques qu'expérimentales, sur la domestication du Mil sont encore très fragmentaires. Il est généralement admis que la domestication du Mil ait pu avoir lieu à plusieurs reprises sur une aire très vaste allant du Tchad à l'Atlantique. Le Mil cultivé existait en Mauritanie, il y a 3 000 ans. Il a probablement été introduit aux Indes, il y a 3 500 ans et il ne serait pas impossible que les premières domestications remontent à 8 000 ans (zone du croissant fertile du Darfour au Hoggar).

FIG. 1. — *Photographie d'un échantillon de Mil spontané* (Pennisetum mollissimum) *mis en herbier* (Provenance : Mali).

a) *Pennisetum mollissimum* (*m*).

Récolté au Mali, dans la région de Gao, à l'écart de toute zone de culture du Mil (*fig.* 1) (récolté par M. BOUDET).

b) *Pennisetum violaceum* (*v*).

Forme spontanée de la région de Bambey (Sénégal) adventice des champs de Mil.

C. *Les hybrides entre formes spontanées et formes cultivées.*

L'ensemble des hybridations réalisées constitue une série à parent constant (*Pennisetum mollissimum*) qui se prête bien à une analyse quantitative des caractères étudiés.

Les croisements réalisés sont :

♀ *Pennisetum mollissimum* (*m*) :

$$\times \begin{cases} \text{♂ « Massue » : (Ma)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« Massue »)} = m \text{ Ma} \\ \text{♂ « Tiotandé » : (T)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« Tiotandé »)} = m \text{ T} \\ \text{♂ « 23 DB » : (DB)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« 23 DB »)} = m \text{ DB} \\ \text{♂ « J 104 » : (J)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« J 104 »)} = m \text{ J} \\ \text{♂ « Sanio » : (Sa)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« Sanio »)} = m \text{ Sa} \\ \text{♂ « Ligui » : (L)} \rightarrow F_1 \text{ (}mollissimum \times \text{« Ligui »)} = m \text{ L} \end{cases}$$

Les hybrides concernant les formes cultivées ont été obtenus avec le même individu : (*m*) utilisé comme parent femelle.

Le croisement entre les 2 formes spontanées était :

$$\underset{(v)}{(\text{♀ } \textit{Pennisetum violaceum}} \times \underset{(m)}{\text{♂ } \textit{Pennisetum mollissimum})} = vm$$

2. — *Conditions d'expérimentation et de mesure*

A. *Les conditions de culture.*

Les plantes ont été cultivées dans les serres du Phytotron à Gif-sur-Yvette (température 28 °C le jour, 20 °C la nuit; humidité relative de 60 p. 100). Pendant les 89 premiers jours, les plantes ont poussé avec les durées de jours réels à Gif (semis le 29 avril 77). Ensuite, la durée du jour a été limitée à 11 h 30 pour induire la floraison des plantes sensibles à la longueur du jour. Les plantes ont été cultivées sur milieu artificiel (1 /2 tourbe, 1 /2 perlite) et arrosées avec une solution minérale complète en alternance avec de l'eau désionisée.

B. *Le dispositif expérimental.*

Les plantes sont disposées en 6 blocs complets randomisés; l'essai comprend 96 individus (chaque bloc comprend 7 couples lignée autofécondée, F_1 et deux représentants de la forme spontanée *P. mollissimum*). Le nombre relativement faible d'individus d'une telle expérience est compensé par le fait que les conditions de milieu sont très stables et très reproductibles (aucun effet bloc significatif) et par l'exploitation simultanée de plusieurs caractères sur chaque plante.

C. *Les caractères étudiés.*

Chaque plante a fait l'objet des mesures et des observations définies ci-dessous.

a) *Caractères quantitatifs* (cf. liste en Annexe 1).

Les caractères relatifs au tallage sont définis sur la figure 2.

Les caractères sont étudiés, d'abord séparément par analyse de variance (tabl. 1), puis globalement dans une analyse en composantes principales (ANDER-

TABLEAU I

Valeurs moyennes et résultats de l'analyse de variance des caractères ayant donné un test F *significatif*
(pour le codage des caractères, cf. annexe 1)

	m	V	*Ma*	DB	L	*Sa*	T	J	*vm*	*m Ma*	*m* DB	*m* L	*m Sa*	*m* T	*m* J		
Effectif n / $\bar{x}$	11	6	6	6	6	5	6	6	6	5	5	6	5	6	6	Var. $\sigma^2 w$ résid.	F_{75}^{14}
PP	23,18	22,67	30,67	32,67	34,00	25,80	30,83	34,83	20,83	23,20	28,20	29,17	22,60	28,00	27,67	3.79	31,90
DA_1T . jours	21,73	20,60	26,50	21,67	26,50	24,00	25,17	21,83	20,33	22,20	20,20	23,33	21,60	26,17	21,33	7,30	4,20
NF_1T	6,00	6,33	7,83	6,33	7,33	7,60	7,00	7,50	6,33	7,00	6,20	6,67	7,00	7,83	7,00	0,91	2,44
ETP . jours	118,09	118,17	60,00	77,33	38,50	119,20	56,33	59,83	119,50	111,20	98,60	78,00	117,60	96,00	92,17	32,35	141,06
NTE	62,73	45,17	2,67	6,00	2,00	4,60	2,17	6,33	54,50	11,40	32,60	19,67	11,80	7,17	32,50	79,65	31,75
NTP	18,64	16,67	5,33	8,33	4,33	4,80	4,33	8,00	18,33	10,20	13,60	15,33	9,20	10,50	15,17	5,19	30,6
NTS	42,00	28,33	0,00	3,50	3,66	0,00	0,00	1,83	37,17	3,83	25,20	21,83	2,60	3,00	24,50	54,39	24,87
NTB	12,82	13,83	3,00	4,33	2,50	2,80	2,67	3,67	10,17	5,20	9,40	4,00	6,40	3,67	6,83	2,92	29,50
RGD	26,91	29,67	14,67	21,00	9,17	32,40	14,17	17,00	26,50	27,20	24,20	18,50	29,00	24,17	21,50	1,59	167,06
RGM	15,55	16,33	10,17	14,17	7,00	17,00	9,17	12,50	15,33	16,20	15,60	9,50	16,80	14,17	12,50	0,86	71,49
LOD . . cm	19,00	5,00	48,83	46,33	28,67	15,20	31,17	35,83	17,50	20,00	48,00	58,67	18,20	52,67	56,50	39,80	45,79
LAD . . mm	17,00	3,40	37,83	33,50	42,00	24,50	37,50	28,50	13,50	23,20	34,20	46,67	26,40	44,50	34,33	33,00	25,57
LOM . . cm	75,73	84,89	79,33	63,67	46,67	111,20	83,50	66,17	101,33	107,60	83,20	79,00	104,40	94,83	85,00	39,47	48,00
LGM . . cm	9,09	8,67	11,33	21,83	10,33	15,00	12,83	10,33	10,50	11,33	11,40	11,00	11,60	12,00	11,00	1,52	39,13
LOP . . cm	17,91	14,83	18,33	34,33	11,33	20,80	30,00	22,33	12,17	26,40	27,00	41,33	21,00	41,33	28,33	34,82	15,55
LAP . . mm	1,18	1,00	5,50	4,83	4,00	5,60	6,33	4,17	1,42	4,00	3,20	3,67	3,00	5,17	3,33	0,33	48,43
LOC . . cm	8,73	8,17	6,75	20,50	7,32	21,40	22,67	18,83	10,33	15,40	17,80	18,17	15,20	28,83	18,00	5,72	44,43
LAC . . mm	20,36	17,67	38,50	16,83	17,50	24,50	30,00	20,50	19,00	25,83	21,40	18,67	25,83	23,33	18,50	7,45	27,49
HAM . . cm	236,27	230,00	129,67	131,50	72,00	364,00	163,83	163,00	314,83	326,00	264,40	315,17	342,83	380,67	286,00	852,00	66,28
PCG . . . g	0,15	0,20	0,62	0,40	0,38	0,64	1,60	0,77	0,19	0,54	0,42	0,44	0,47	0,50	0,49	0,006	121,69

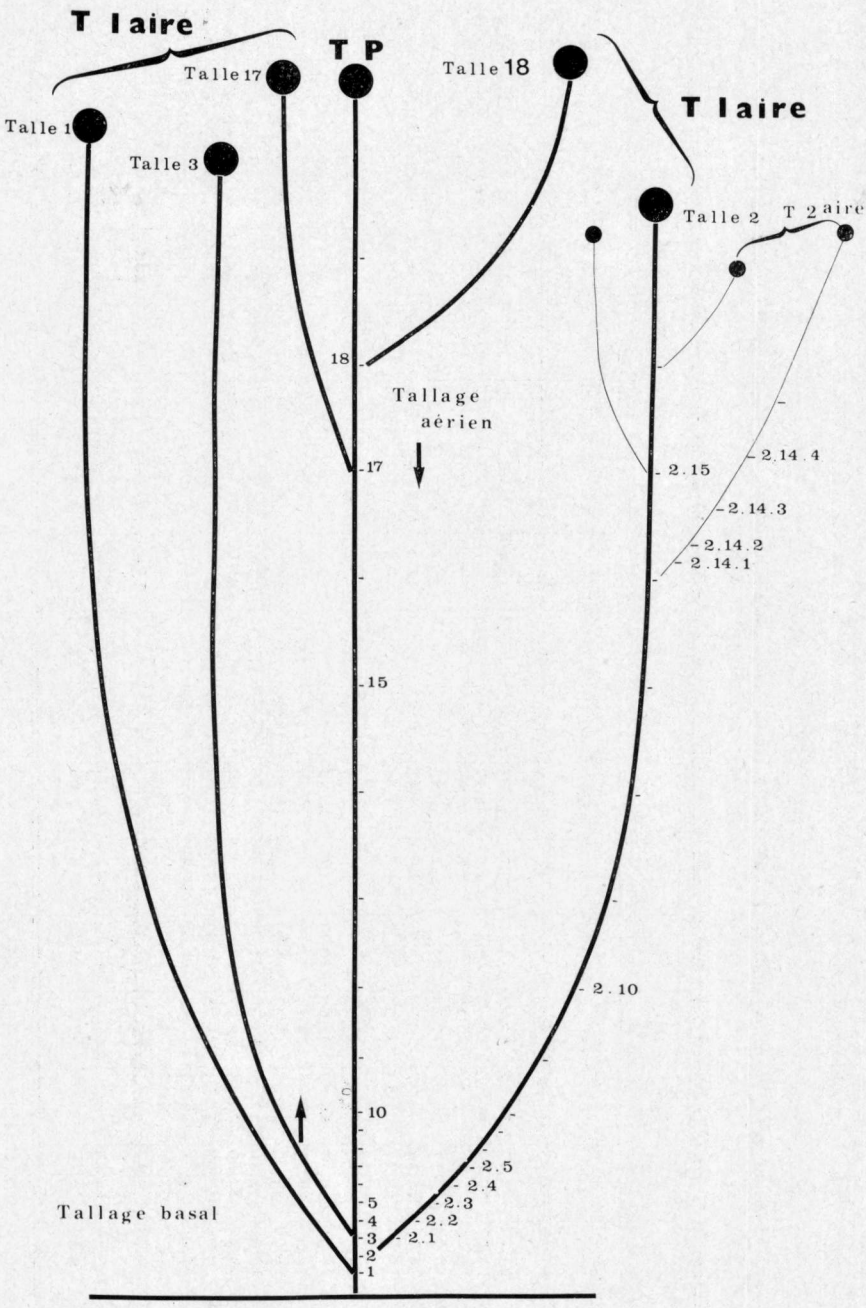


FIG. 2. — *Organisation schématique d'un pied de Mil.*

TP = *talle principale ;* T^{1aire} = *talle primaire* prenant naissance à l'aisselle d'une feuille de la talle principale. (Ex. : T_1, T_2, T_{18}).

T^{2aire} = *talle secondaire* prenant naissance à l'aisselle d'une feuille d'une talle primaire (Ex. T 3-1, T 3-2, ..., T 3-10, T 18-1, T 18-2 ... T 18-6). *(Suite au bas de la page 235)*

SON, 1960). Les coordonées des points représentatifs des individus dans ce système de composantes peuvent être considérées comme de nouvelles variables et traitées en statistique classique. Nous obtenons ainsi une interprétation plus synthétique des résultats en diminuant le nombre des variables étudiées. (5 composantes au lieu des 26 caractères de départ). Le nombre des composantes retenues est fixé par la valeur de l'inertie de chacune d'entre elles; on s'arrête quand celle-ci devient inférieure à la contribution d'un caractère unique.

b) *Caractères qualitatifs* (cf. liste en Annexe 1).

Ce nouvel ensemble des données (qualitatifs + quantitatifs codés) est traité par l'analyse des correspondances (BENZECRI, 1973). Le type de codage des caractères qualitatifs et quantitatifs est indiqué dans l'Annexe 1.

Résultats et interprétation

1. — *Comportement d'ensemble des hybrides F_1*

Toutes les plantes F_1 étaient viables. Nous n'avons pas observé de phénomène de stérilité : au contraire, la fertilité pollinique est élevée et la récolte en grains importante tant en autofécondation qu'en fécondation libre. Le déroulement de la méiose paraissait normal, 7 bivalents se constituant régulièrement et les chromosomes se distribuant de façon équilibrée en anaphase. Les plantes F_1 étaient caractérisées par des chandelles lâches dont les épillets possédaient des soies abondantes (fig. 3 et 4), une forte tendance à l'égrenage spontané et une persistance importante des enveloppes autour du grain à maturité (grain vétu comme chez le parent spontané).

2. — *Analyse caractère par caractère*

Les moyennes et résultats de l'analyse de variance sont rapportés dans le tableau 1 pour les 20 caractères ayant donné un F significatif. La comparaison multiple des moyennes permet de classer les génotypes entre eux et de construire un dendrogramme en utilisant un indice de proximité (PERNÈS *et al.*, 1970). Les résultats sont représentés figure 5.

Ce classement définit trois grands groupes :

— les mils spontanés (*m*, *v* et leur hybride *vm*),

— les mils cultivés (DB — J — L — Ma — T) sauf « Sanio » (Sa),

— les hybrides F_1 entre formes spontanées et formes cultivées et la forme cultivée « Sanio ».

En règle générale, plus une talle démarre à un niveau élevé moins elle aura de feuilles avant l'apparition du drapeau.

Les *talles basales* T_1, T_3, T_4 ... ont presque autant de feuilles que la talle principale. Les *talles aériennes* en ont très peu. Le tallage basal a lieu de façon précoce et se fait de façon ascendante; le tallage aérien a lieu après émission de la chandelle qui porte ces talles et se fait en descendant.

L'observation des hybrides F_1 montre qu'il existe un « type hybride » moyen très caractéristique, auquel les cultivateurs africains donnent des noms vernaculaires (c'est le « N'doul » des sénégalais ou le « Shibra » des nigériens). Ces hybrides F_1 sont des plantes grandes (leur hauteur moyenne à maturité $\overline{HAM}$ = 264 à 380 cm) et vigoureuses. Ils présentent un nombre d'étages foliaires ($\overline{RGD}$) variant de 18 à 29. Ils sont tardifs ($\overline{ETP}$) dans les conditions de l'expérience. Seuls les F_1 avec Ligui ont une précocité comparable à celle des lignées cultivées autres que

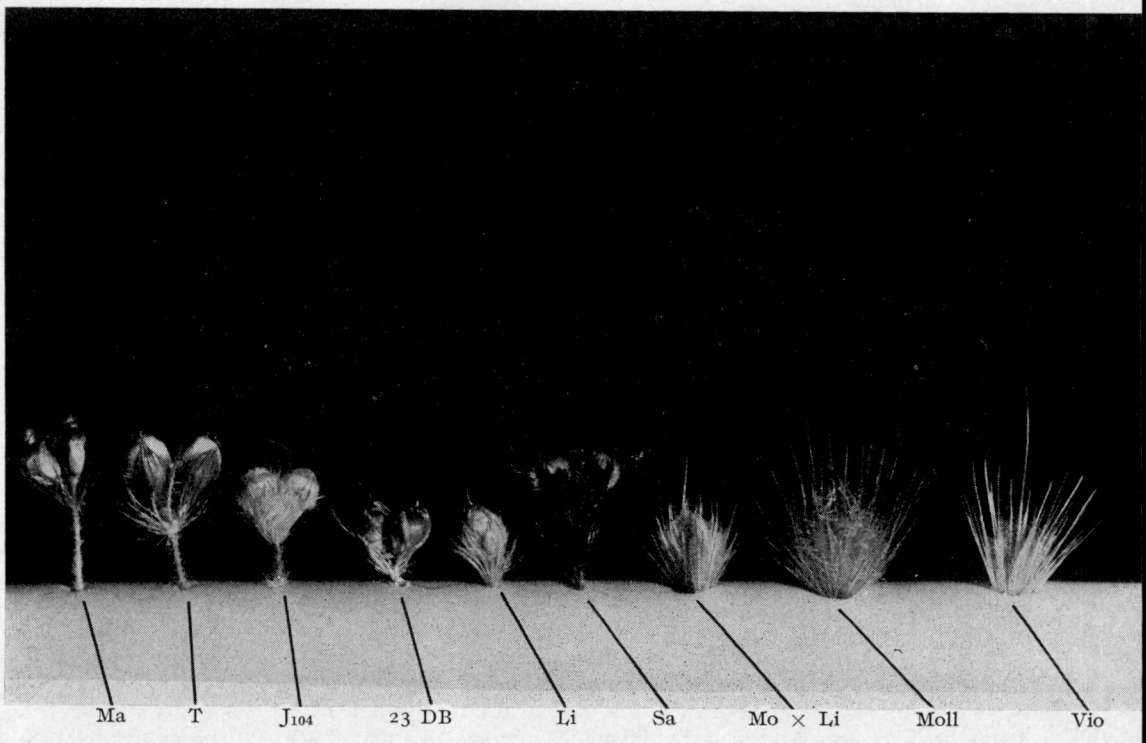


FIG. 3. — *Aspect des épillets des formes cultivées, des formes spontanées et d'un hybride.* On notera l'absence de pédicelle chez les formes spontanées et hybrides et les soies abondantes. Les grains des formes cultivées sont visibles. Ceux des formes spontanées et hybrides sont cachés par les soies de l'involucre.
Ma = Massue; T = Tiotandé; J_{104}; 23 DB; Li = Ligui; Sa = Sanio.
Mo × Li = F_1 (*P. mollissimum* × *P. americanum* (cultivar Ligui)) Moll = *P. mollissimum*; Vio = *Pennisetum violaceum*.

« Sanio ». Les chandelles de tous les hybrides sont très semblables entre elles à part quelques variations dans la longueur et la largeur ($\overline{LOC}$ = 15,2 à 28,8 cm — $\overline{LAC}$ = 18,5 à 25,8 mm). La taille des grains est très proche de celle des formes cultivées (fig. 6), mais ils sont de forme ovoïde comme ceux des formes spontanées.

Le caractère PCG (poids de cent grains) nous permet de faire les quelques remarques suivantes :

— certains hybrides F_1 ont des tailles de grains supérieures à certains culti-

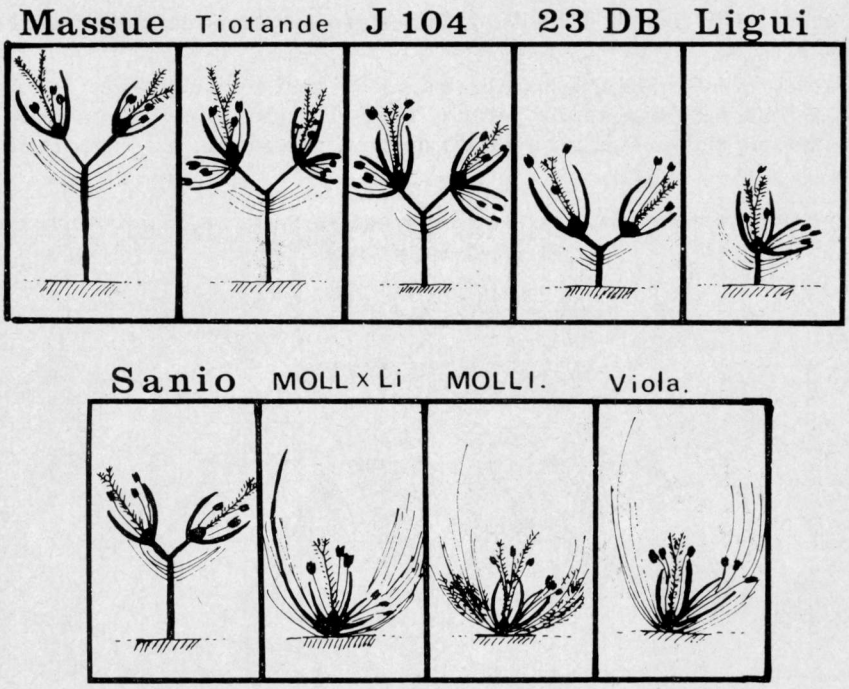


FIG. 4. — *Diagramme représentant la structure des épillets des plantes de la figure 3.* On notera qu'il peut y avoir dans les épillets des fleurs hermaphrodites (♀) et des fleurs mâles (♂).

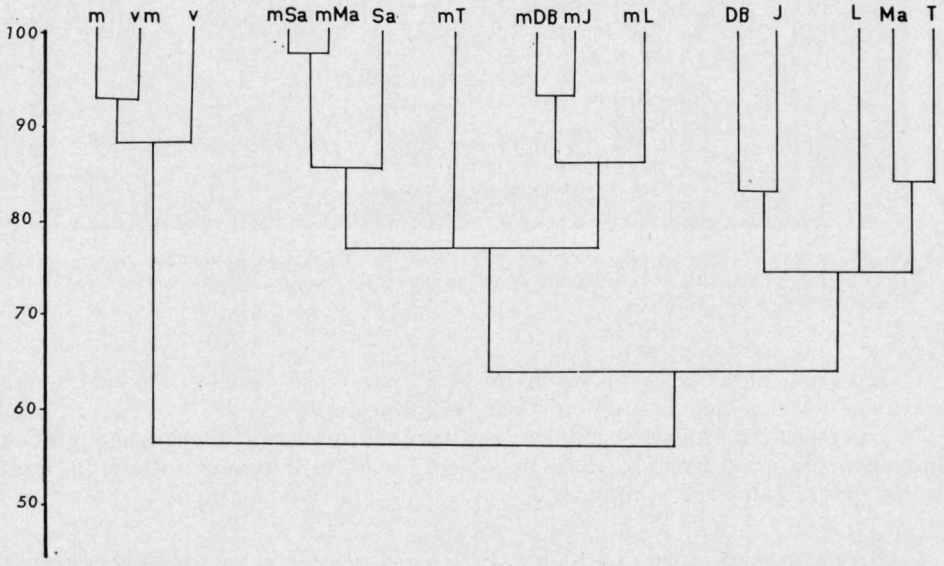


FIG. 5. — *Dendrogramme donnant les distances entre les différents génotypes étudiés.* Ce dendrogramme est établi d'après le calcul d'un indice de proximité calculé sur les 26 caractères quantitatifs étudiés.

vars et en particulier, le PCG des hybrides dépasse dans tous les cas celui de « Ligui », « Massue » et « 23 DB »;

— les formes spontanées ont des grains qui sont toujours petits. Les formes cultivées ont des grains tantôt petits (« Ligui »), tantôt gros (« Tiotandé »). Les différences de taille entre les hybrides ne sont, par contre, pas significatives.

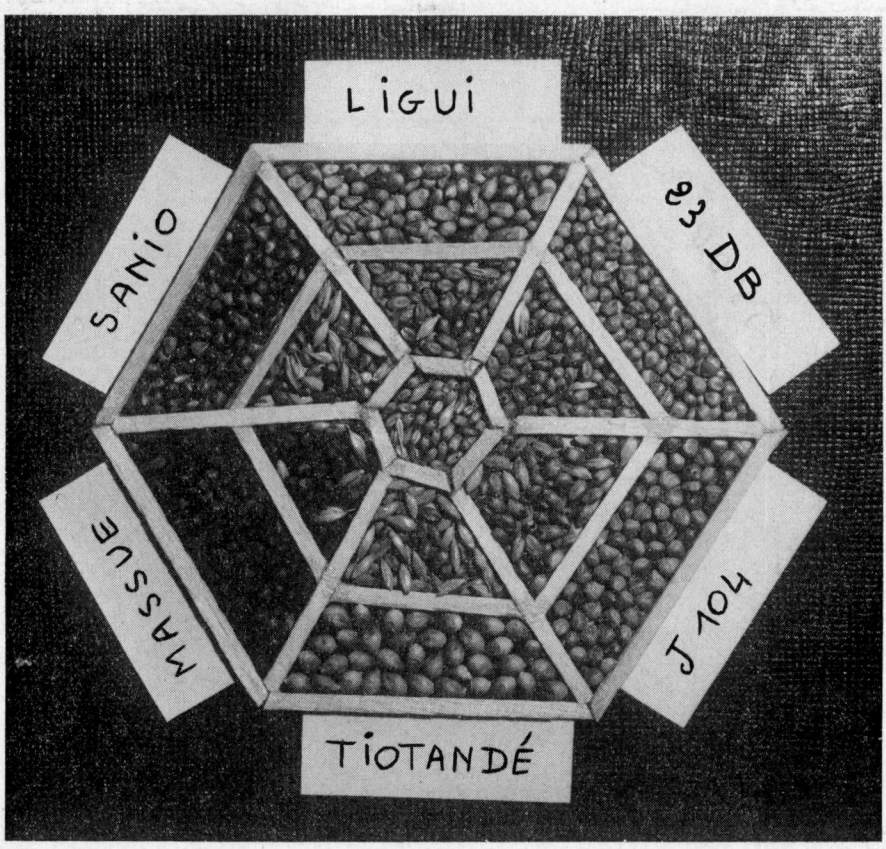


FIG. 6. — *Aspect des graines des divers génotypes étudiés.* Au centre *Pennisetum mollissimum;* à la périphérie les différents cultivars de *Pennisetum americanum.* En position intermédiaire, les hybrides F_1.

Les rendements en grains des hybrides F_1 paraissent élevés et peuvent dépasser dans certains cas ceux obtenus sur les formes cultivées (*).

La coloration du grain « cultivé » est dominante sur celle du sauvage; grâce à la couleur du grain hybride, il est possible d'identifier le parent cultivé qui a été utilisé pour réaliser le croisement.

(*) Poids moyen de grains récoltés sur *P. mollissimum, violaceum* et vm : $\overline{PG}$ = 24,02 g. Écart-type : 19,69.
Poids moyen de grains récoltés sur les lignées : $\overline{PG}$ = 51,68 g — Écart-type : 24,75.
Poids moyen de grains récoltés sur les hybrides : $\overline{PG}$ = 82,29 g — Écart-type : 22,77.

3. — *Analyse en composantes principales des caractères quantitatifs*

A. *Valeur et signification des axes*

Les pourcentages d'inertie des cinq premiers axes sont les suivants :

— axe 1 : 40,66 p. 100,
— axe 2 : 17,90 p. 100,
— axe 3 : 8,65 p. 100,
— axe 4 : 5,98 p. 100,
— axe 5 : 5,02 p. 100.

L'axe 6 avec seulement 3,5 p. 100 de l'inertie globale a une contribution inférieure à celle d'un caractère unique $\frac{\text{Inertie globale}}{\text{nbr de caractères}} = \frac{100}{26} = 3{,}85$ p. 100).

Les 5 premiers axes rendent compte de 78,21 p. 100 de la variabilité globale. Les caractères qui contribuent le plus à la définition des axes sont mentionnés dans l'annexe 3.

La figure 7 montre comment se distribuent les points médians des différentes familles (parents et hybrides) dans le système d'axes 1-2 (58,56 p. 100 de la variabilité globale). L'axe 1 exprime clairement l'opposition entre les formes spontanées et les formes cultivées. Les hybrides F_1 occupent une position intermédiaire. L'axe 2 oppose « Sanio » à toutes les autres formes parentales et place le nuage des

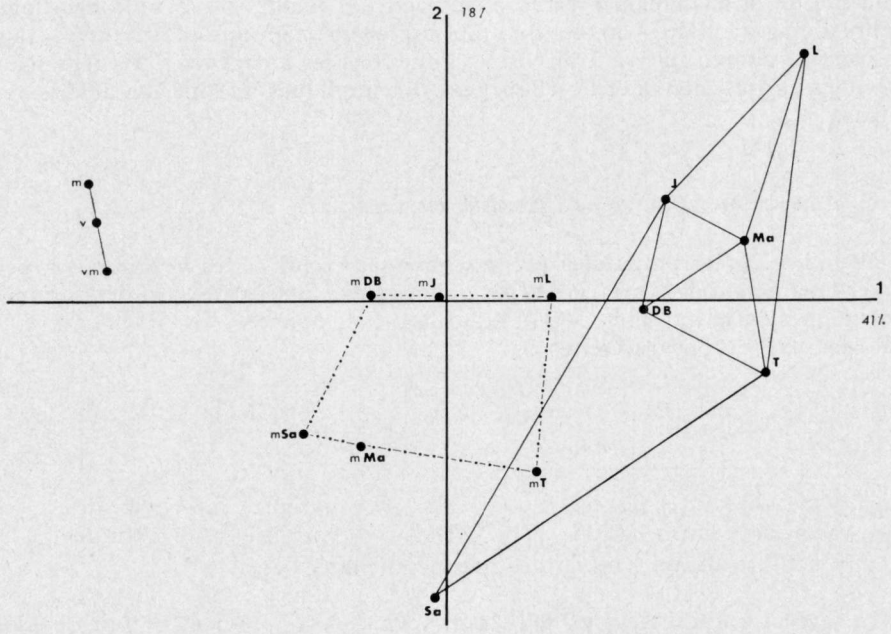


FIG. 7. — *Graphique donnant la disposition des points médians représentatifs des différents génotypes dans une analyse en composantes principales portant sur 26 caractères quantitatifs.* (Axes 1-2).

F_1 à l'extérieur des nuages parentaux dans le sens d'un accroissement de la taille des plantes et du format des feuilles et des chandelles (effets non-additifs).

B. *Analyses sur les composantes.*

a) *Analyses de variance.*

En reprenant comme nouvelles variables les coordonnées des points représentatifs des différents génotypes, nous avons effectué les analyses de variance pour les 5 premiers axes. Les carrés moyens (C.M.) obtenus ainsi que les résultats des tests F sont regroupés dans le tableau 2. Nous n'obtenons aucun effet « bloc » significatif. Tous les effets génotypes sont significatifs au seuil de 1 p. 100.

b) *Série à parent constant: régression linéaire.*

Le choix des croisements étudiés (série à parent constant) permet une interprétation en termes de régression linéaire des résultats expérimentaux. Les calculs des régressions regroupés dans le tableau 3 montrent que seule la régression calculée à partir des données de l'axe 1 est significative ($r = 0{,}93$).

Pour cet axe, le modèle linéaire permet de faire une bonne prédiction de la valeur de l'hybride quand on connaît le parent cultivé (fig. 8). En d'autres termes, l'ensemble des caractères qui contribuent à l'axe 1 (précocité-tallage-diamètre du pédoncule de la chandelle- rythme d'émission des feuilles de la talle principale-nombre d'étages foliaires- largeur du drapeau) forme un groupe additif qui se transmet bien du parent cultivé à l'hybride. Pour tous les autres axes, les régressions ne sont pas significatives et les effets géniques impliqués ne sont pas uniquement additifs.

c) *Analyse quantitative de l'hérédité des caractères*

Pour les lignées parentales (*P. mollissimum* exclu) et les hybrides, on peut estimer séparément des variances génotypiques entre lignées (VG_L) et des variances génotypiques entre hybrides (VG_H), er utilisant les données des tableaux 4 et 5 à l'aide des expressions suivantes :

$$(1)\quad \boxed{VG_L = \frac{CM_{BL} - CM_{WL}}{4n}} \qquad (2)\quad \boxed{VG_H = \frac{CM_{BH} - CM_{WH}}{n}}$$

CM_{BL} = variance inter-lignées $\qquad$ CM_{BH} = variance inter-hybrides
CM_{WL} = variance intra-lignées $\qquad$ CM_{WH} = variance intra-hybrides
n = nombre de répétitions des génotypes dans l'essai = 6

Le facteur 4 qui intervient dans la formule de VG_L provient du fait que, lors du calcul des espérances des carrés moyens, l'effet gamétique moyen intervient 2 fois pour les lignées et une fois pour les hybrides car un des parents est constant. On trouvera dans le tableau 6 les valeurs de VG_L et VG_H ainsi qu'une estimation

TABLEAU 2

Analyses de variance réalisées sur les variables synthétiques : valeurs des carrés moyens et tests F de signification des variances pour les 5 premiers axes

Origine de la variation	Degrés de liberté	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Axe 4		Axe 5		
		C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	F 1 %
Effet bloc . . .	5	0,61	1,99 NS	0,37	0,95 NS	0,86	2,53 NS	0,99	2,06 NS	0,88	1,53 NS	$F^{5}_{75} = 3,34$
Effet génotype .	15	65,69	214,46 HS	29,54	77,17 HS	13,00	38,20 HS	7,34	15,29 HS	5,19	9,01 HS	$F^{15}_{75} = 2,35$
Résiduelle . . .	75	0,31	—	0,38	—	0,34	—	0,48	—	0,58	—	

TABLEAU 3

Tests de signification des régressions parents-hybrides réalisés sur les variables synthétiques (axes 1 à 5) *et valeurs correspondantes des coefficients de corrélation*

Origine de la variation	Degrés de liberté	Axe 1 $r = 0,93$		Axe 2 $r = 0,60$		Axe 3 $r = 0,62$		Axe 4 $r = 0,19$		Axe 5 $r = 0,09$	
		C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F
Écarts à la moyenne (s^2_y)	6	4,57	—	2,88	—	2,09	—	0,18	—	0,60	—
Régression	1	23,86	33,14 HS	6,23	2,84 NS	4,79	3,09 NS	0,04	< 1 NS	0,03	< 1 NS
Écarts à la régression (résiduelle $s^2_{y.x}$) . .	5	0,72	—	2,19	—	1,55	—	0,21	—	0,71	—

au seuil 1 p. 100 $F^{1}_{5} = 16,3$

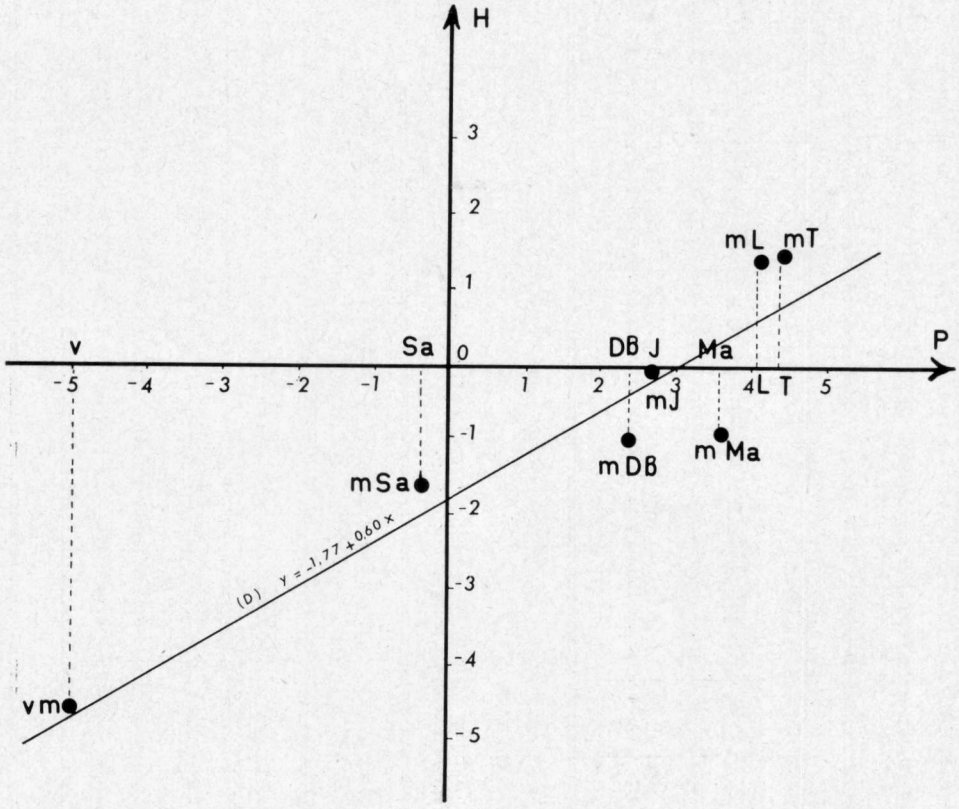


FIG. 8. — *Graphique illustrant la régression parents-hybrides pour les coordonnées sur l'axe 1 des points représentatifs des génotypes.* ($r = 0{,}93$ — Le test de la régression est significatif à 1 p. 100).

de l'héritabilité au sens large, pour chaque composante, en utilisant l'expression h^2 suivante :

$$h^2 = \frac{VG_H}{V_W + V_{GH}} = \frac{\text{variance génotypique des hybrides}}{\text{variance phénotypique des hybrides}}$$

V_W = estimation de la variance résiduelle.

La cohérence des lectures faites par les variances inter-lignées et inter-hybrides montre que, d'un point de vue de l'hérédité quantitative, l'hybridation interspécifique avec *P. mollissimum* n'introduit pas de distorsion particulière. Dans cette analyse, on voit que les gros blocs de variabilité génétique exploitable ne sont pas à rechercher au delà du troisième axe.

TABLEAU 4

Estimations des variances inter-lignées et intra-lignées pour les 5 premiers axes de l'analyse en composantes principales

Origine de la variation	Degrés de liberté	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Axe 4		Axe 5	
		C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F
Inter-lignées (B_L) . .	7 — 1 = 6	65,61	THS 227,16	41,38	THS 238,64	13,45	HS 39,92	14,91	HS 23,55	5,13	HS 4,93
Intra-lignées (W_L) .	35	0,29	—	0,17	—	0,34	—	0,63	—	1,04	

seuil 1 p. 100 F_3^6 = 3,30

TABLEAU 5

Estimations des variances inter-hybrides et intra-hybrides pour les 5 premiers axes de l'analyse en composantes principales

Origine de la variation	Degrés de liberté	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Axe 4		Axe 5	
		C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F	C.M.	F
Inter-hybrides (B_H) .	7 — 1 = 6	27,33	HS 89,74	15,67	HS 26,72	13,01	HS 24,15	0,95	HS 1,60	3,24	HS 10,62
Intra-hybrides (W_H) .	35	0,31	—	0,59	—	0,54	—	0,59	—	0,31	—

seuil 1 p. 100 F_3^6 = 3,30

TABLEAU 6

Estimations des variances génétiques des lignées et des hybrides pour chacun des axes étudiés. Calcul de l'héritabilité au sens large pour les variables synthétiques correspondantes

	VG lignées	VG hybrides	Héritabilité $h_2 = \frac{VG_H}{Vw + VG_H}$
Axe 1	2,73	4,51	0,94
Axe 2	1,76	2,78	0,88
Axe 3	0,56	2,30	0,84
Axe 4	0,61	0,07	0,50
Axe 5	0,17	0,54	0,45
TOTAL	5,83	10,20	

4. *Analyse des correspondances*

Les pourcentages d'inertie des cinq premiers axes sont les suivants :

— Axe 1 : 47,57 p. 100,
— Axe 2 : 12,20 p. 100,
— Axe 3 : 7,90 p. 100.
— Axe 4 : 5,19 p. 100.
— Axe 5 : 4,51 p. 100.

Les caractères qui contribuent le plus à la définition des axes sont mentionnés dans l'Annexe 5. La figure 9 montre comment se distribuent les points médians des différentes familles de parents et hybrides dans le système d'axes 1-2 (59,77 p. 100 de la variabilité globale).

La tendance générale observée ne diffère pas sensiblement de ce que l'on avait observé dans l'analyse en composantes principales. Certaines remarques peuvent cependant être faites quant à l'apport des caractères qualitatifs. L'axe 1 oppose toujours clairement les formes spontanées et les formes cultivées avec un rôle important joué par la vitrosité du grain, sa couleur, la présence d'enveloppes ainsi que la caducité des épillets et l'abandonce des soies. Le caractère précocité (ETP) n'oppose pas exclusivement formes spontanées et cultivées puisque « Sanio », cultivé tardif, est, pour ce caractère, comparable à *P. mollissimum*, *P. violaceum*, et leur hybride (*vm*).

L'axe 2 exprime surtout la diversité entre les formes cultivées : outre les caractères quantitatifs déjà vus dans l'analyse en composantes principales, il est caractérisé par la structure des épillets (1 ou 2 fleurs) et l'étalement de la floraison.

Les hybrides restent plus groupés que dans l'analyse en composantes principales; ils sont pratiquement alignés avec les parents (absence d'hétérosis sauf pour « Ligui » et « J 104 »).

L'analyse des correspondances rend bien compte de l'impression visuelle d'ensemble donnée par le type « N'Doul » habituellement bien identifié par les cultivateurs.

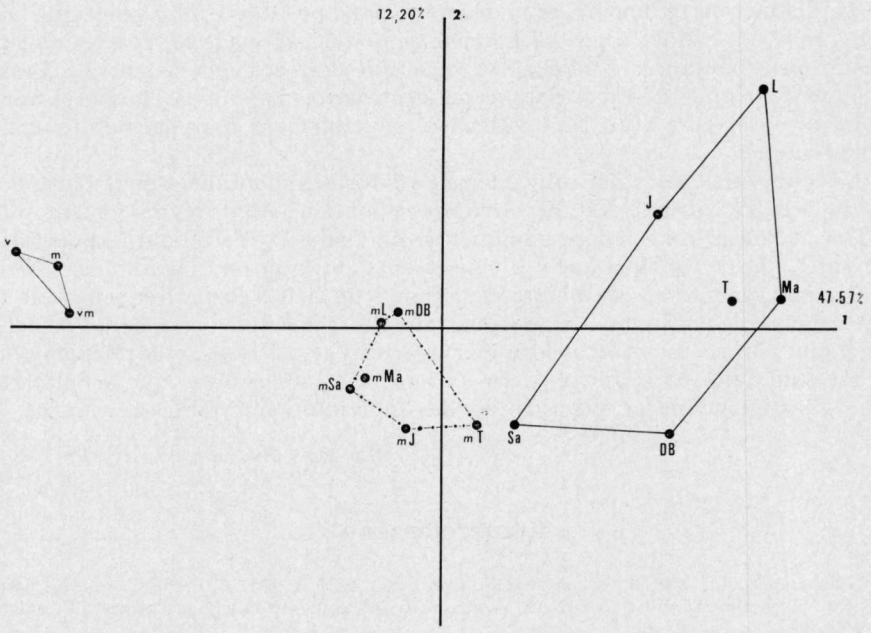


FIG. 9. — *Graphique donnant la disposition des points médians représentatifs des différents génotypes dans une analyse des correspondances portant sur l'ensemble caractères quantitatifs plus caractères qualitatifs.*

Discussion — Conclusion

Les caractères associés aux types spontanés ou cultivés sont très lisibles et l'on peut définir un « syndrome spontané » et un « syndrome cultivé ».

Syndrome spontané

- tallage précoce, abondant et non limité;
- rythme d'émission foliaire lent;
- drapeau étroit (dernière feuille avant la chandelle);
- pédoncule de la chandelle très fin;
- poids de 100 grains faible (grains petits);
- grains vêtus, ovoïdes, non colorés (jaune clair);
- épillets sessiles avec de nombreuses soies, dont une, plus longue que les autres.

Syndrome cultivé

- tallage tardif, modéré ou nul;
- rythme d'émission des feuilles rapide;
- drapeau large (dernière feuille avant la chandelle);
- pédoncule de la chandelle large;
- poids de 100 grains élevé (gros grains);
- grains nus de forme plus ou moins pyramidale souvent colorés (gris-bleutés-marrons);
- épillets pédicellés avec des soies peu abondantes.

La distinction taxonomique ne recouvre donc pas une réalité génétique au vu des hybrides F_1 : il n'y a pas de barrière reproductive entre les formes cultivées et les formes spontanées étudiées. On verra que dans les générations F_2 (PERNES *et al.*, 1980) quelques désorganisations peuvent parfois apparaître. L'expression des caractères observés est du type rencontré généralement dans les confrontations intraspécifiques.

Les cultivars coexistent souvent avec les formes spontanées dans l'aire d'origine du Mil (en Afrique), et des hybrides spontanés sont régulièrement observés. Les mécanismes d'échanges géniques seront analysés en étudiant les générations ultérieures : F_2 et F_3, ainsi que des croisements en retour sur les formes cultivées.

Ces croisements en retour qui correspondent à une étape fréquemment rencontrée dans les champs, en Afrique, pourraient être une des voies possibles d'échanges géniques efficaces entre les formes spontanées et cultivées, si le phénotype cultivé est suffisamment retrouvé, avec un niveau de vigueur tel que le cultivateur puisse sélectionner parmi ces plantes, des individus pour faire sa semence.

Reçu pour publication en janvier 1980

Remerciements

Nous remercions toutes les personnes qui ont collaboré à cette étude ainsi que les responsables du Phytotron (C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette) qui ont veillé au bon déroulement des cultures.

Summary

Genetic analysis of the relationships between spontaneous and cultivated forms of Pearl millet

I. — *Study of the parents and F_1 generation obtained by crossing one ecotype of* Pennisetum mollissimum *Hocht (spontaneous form) and several cultivars of* Pennisetum americanum *(L.) Leeke.*

This study deals with the comparison of 6 lines of Pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) and their F_1 hybrids with one plant of *P. mollissimum* Hochst. The simultaneous analysis of 26 quantitative characters and 15 qualitative ones allows us to obtain a good description of the cultivars, of the spontaneous form and of the F_1 generation. No reproductive barrier has been shown between cultivated and spontaneous plants. The analysis of the regression parents-F_1 hybrids allow us to give some conclusions about the quantitative heredity of some characters.

Références bibliographiques

ANDERSON T. W., 1960. *An introduction to multivariate statistical analysis.* John Wiley and sons. INC. New-York. London.

BENZECRI J. P., 1973. *L'analyse des données*, tome I. « *La taxinomie* ». Tome II « *l'analyse des correspondances* ». Dunod, Paris.

BILQUEZ A. F., et LECOMTE J., 1969. Relations entre mils sauvages et mils cultivés : étude de l'hybride *Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb × *Pennisetum violaceum* L. (Rich). *Agron. trop.*, **24**, 249-257.

BRUNKEN J., DE WET J. M. J., HARLAN J. R., 1977. The morphology and domestication of Pearl millet. *Econ. Bot.*, **31**, 163-174.

JACQUES-FELIX H., 1962. *Les graminées d'Afrique tropicale. I. généralités, classification, description des genres.* I.R.A.T., Paris, 1962.

PERNÈS J., COMBES D., RENE-CHAUME R., 1970. Différenciation des populations naturelles de *Panicum maximum* Jacq. en Côte-d'Ivoire par acquisition de modifications transmissibles, les uns par graines apomictiques, d'autres par multiplication végétative. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **270**, 1992-1995.

PERNÈS J., 1975. *Organisation évolutive d'un groupe agamique : la section des Maximae du genre* Panicum (*Graminées*), Mémoire O.R.S.T.O.M. nº 75 Paris. Thèse Paris XI, Orsay (1972).

PERNÈS J., NGUYEN VAN ÉLISABETH, BENINGA M., BELLIARD J., 1980. Analyse des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke, *P. mollissimum* Hochst). II. Étude de 3 familles F_2 issues d'hybrides entre 3 lignées de Mil cultivé, *Pennisetum americanum* (L.), Leeke. *Ann. Amélior. Plantes*, **30** (3), 253-269.

SNEATH P. H. A., SOKAL R. R., 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman. San Francisco.

Annexe 1

Groupe de caractères		Caractère	Signification	États qualitatifs possibles
		LOC(*)	longueur de la chandelle de la talle principale en cm	
		LAC(*)	diamètre de la chandelle de la talle principale en mm	
Description de la chandelle		LOP(*)	longueur du pédoncule de la chandelle en cm	
		LAP(*)	largeur du pédoncule de la chandelle en mm	
		SHED(*)	caducité du grain	o = absence 1 = présence
FEUILLES	Drapeau	LOD(*)	longueur du limbe du drapeau en cm	
		LAD(*)	largeur du limbe du drapeau en mm	
		LGD(*)	longueur de la gaine du drapeau en cm	
		RGD(*)	rang de la dernière feuille de la talle principale	
	La plus grande feuille	LOM(*)	longueur de la plus longue feuille de la talle principale en cm	
		LAM(*)	largeur de la plus longue feuille de la talle principale en mm	
		LGM(*)	longueur de la gaine de la plus longue feuille de la talle principale en cm	
		RGM(*)	rang de la plus longue feuille de la talle principale	
	Rythme d'émission des feuilles (plastochrone)	PP(*)	pente de la courbe d'émission des feuilles sur la talle principale	
		PP_1(*)	pente de la courbe d'émission des feuilles sur la première talle apparue.	

Groupe de caractères	Caractère	Signification	États qualitatifs possibles
Caractéristiques de la talle principale	DT(*)	diamètre de la talle principale.	
	HAM(*)	hauteur à maturité de la talle principale (chandelle comprise).	
Caractéristiques du tallage	NTE(*)	nombre de talles à l'épiaison.	
	NTP(*)	nombre de talles primaires.	
	NTS(*)	nombre de talles secondaires.	
	NTT(*)	nombre de talles tertiaires.	
	NTB(*)	nombre de talles basales.	
	NTAR(*)	note de tallage aérien.	0 = absent 1 = un peu 2 = beaucoup
	DAIT(*)	date du début du tallage.	
	MFIT(*)	nombre de feuilles sur la talle principale quand apparaît la 1re talle primaire.	
Précocité et floraison	ETP(*)	délai d'épiaison de la talle principale compté en jours à partir du semis.	
	E_1TA(*)	délai d'épiaison de la 1re talle primaire apparue.	
	SFT	étalement de la floraison.	0 = floraison groupée 1 = floraison étalée
Structure de l'épillet	1F	épillet à une fleur.	0 = non 1 = oui
	2F	épillet à 2 fleurs.	0 = non 1 = oui
	FM	présence d'une fleur mâle dans l'épillet	0 = non 1 = oui
	LPI	longueur du pédicelle de l'involucre	0 = pas de pédicelle 1 = court 2 = long
	1 + GD	parmi les soies, il en existe une plus longue que les autres	0 = non 1 = oui
	NB	soies abondantes	0 = non 1 = oui
	LG	longueur des soies.	0 = courtes 1 = moyennes 2 = longues

Groupe de caractères	Caractère	Signification	États qualitatifs possibles
Caractères du grain. . .	FG	forme du grain.	0 = ovoïde (Molli) 1 = intermédiaire 2 = forme cultivée
	CG	couleur du grain .	0 = jaune clair (Molli) 1 = gris clair ou marron clair 2 = gris ou marron foncé
	VI	vitrosité du grain.	0 = vitreux (Molli) 1 = intermédiaire (Ligui) 2 = farineux (Massue, 23 DB)
	ENVE . . .	présence d'une enveloppe autour du grain.	0 = grain complément enveloppé (Molli) 1 = grain à demi enveloppé 2 = grain nu (cultivé)
	PCG(*) . . .	poids de cent grains en g.	

(*) Désigne les caractères quantitatifs non mis en classes pour l'analyse.

Annexe 2

Signification des axes de l'analyse en composantes principales (caractères quantitatifs seuls)

λ_i = valeur propre de l'axe i,
$i \# F$ = coordonnées sur l'axe i des points représentatifs des caractères,
CTR = contribution relative d'un caractère à un axe.

	Axe 1 $\lambda_1 = 10{,}98$		Axe 2 $\lambda_2 = 4{,}83$		Axe 3 $\lambda_3 = 2{,}33$		Axe 4 $\lambda_4 = 1{,}61$		Axe 5 $\lambda_5 = 1{,}35$	
Caractères	1 # F	CTR	2 # F	CTR	3 # F	CTR	4 # F	CTR	5 # F	CTR
1 PP	+ 0,83	62								
2 PP_1							+ 0,69	298		
3 DA_1T									+ 0,55	221
4 RM_1V										
5 NF_1T									+ 0,52	197
6 ETP	— 0,88	71								
7 E_1TA										
8 NTE	— 0,86	68								
9 NTP										
10 NTS	— 0,78	56								
11 NTT										
12 NTB	— 0,87	70								
13 RGD	— 0,79	57								
14 LOD					— 0,63	169				
15 LAD	+ 0,77	54								
16 LGD										
17 RGM	— 0,72	48								
18 LOM			— 0,83	143						
19 LAM										
20 LGM									— 0,41	121
21 LOP					— 0,63	171				
22 LAP	+ 0,86	67								
23 LOC			— 0,62	79						
24 LAC							— 0,39	97		
25 HAM			— 0,74	113						
26 PCG							— 0,39	97		

Annexe 3

Signification des axes de l'analyse des correspondances (caractères quantitatifs codés et caractères qualitatifs)

	Axe 1 $\lambda_1 = 16{,}17$		Axe 2 $\lambda_2 = 4{,}15$		Axe 3 $\lambda_3 = 2{,}69$		Axe 4 $\lambda_4 = 1{,}76$		Axe 5 $\lambda_5 = 1{,}53$	
Caractères	1 # F	CTR	2 # F	CTR	3 # F	CTR	4 # F	CTR	5 # F	CTR
1 PP	+ 0,73	54								
2 DA_1T							+ 1,10	351		
3 NF_1T										
4 ETP	— 0,73	73								
5 RGD	— 0,73	74								
6 LOD					— 0,67	143				
7 LAD					— 0,64	142				
8 LGD										
9 RGM	— 0,62	54								
10 LOM										
11 LAM										
12 LGM			— 0,43	57						
13 LOP			— 0,58	59	— 0,54	79			— 0,50	120
14 LAP										
15 LOC										
16 LAC										
17 HAM			— 0,50	67			+ 0,45	132		
18 PCG										
19 1F			— 0,74	96					+ 0,66	209
20 2F			+ 0,64	129						
21 FM			+ 0,64	129						
22 LPI										
23 1 + GD	— 0,80	47								
24 NB										
25 LG	— 0,71	78								
26 FG	+ 0,65	58								
27 CG	+ 0,65	58								
28 VI	+ 0,60	46			— 0,38	114				
29 SHED	— 0,80	47								
30 ENV	— 0,80	47								
31 NTAR										
31 SFT			+ 0,94	116						
32 DT			— 0,68	84						

NB : tous les caractères précédemment étudiés n'ont pas été intégralement réutilisés dans cette analyse.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 253-269.

Analyse des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle (*Pennisetum americanum* (L.), Leeke, *P. mollissimum* Hochst)

II. — Etude de 3 familles F_2 issues d'hybrides entre une plante d'un écotype de *Pennisetum mollissimum* Hochst et 3 lignées de Mil cultivé, *Pennisetum americanum* (L.), Leeke

J. PERNÈS, É. NGUYEN VAN, M. BENINGA et J. BELLIARD

Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement des Plantes
Service Génétique C.N.R.S.,
91190 Gif-sur-Yvette, France.

Résumé

Cette étude concerne 3 familles F_2 obtenues à partir de 3 lignées de Mil cultivé : *P. americanum* (« 23 DB », « Ligui », « Massue ») croisées avec une même plante d'un écotype de Mil spontané *P. mollissimum*. L'analyse multivariée de 35 caractères permet d'apprécier les possibilités de recombinaison et la nature des ségrégations. Aucun obstacle reproductif absolu ni d'inviabilité totale ne se sont manifestés. Les échanges géniques semblent très faciles entre les formes cultivées et la forme spontanée utilisée. La distance génétique entre « Massue » et la forme spontanée semble supérieure à celles concernant « Ligui » et « 23 DB ». Certains aspects du processus de domestication de cette céréale peuvent être envisagés à partir de ces résultats.

Introduction

L'étude d'une série de croisements effectués entre une forme spontanée, *P. mollissimum* et plusieurs lignées cultivées a été rapportée dans l'article précédent (BELLIARD *et al.*, 1980).

Toutes les plantes obtenues étaient diploïdes, fertiles et de développement normal avec une très bonne régularité dans la transmission des caractères des différents parents.

A partir de 3 de ces hybrides la génération suivante a été obtenue par autofécondation afin d'étudier les deux problèmes suivants :

1. — existe-t-il des anomalies particulières, des expressions de profonde

désorganisation dans ces plantes réunissant les chromosomes des formes spontanées et cultivées ?

2. — peut-on acquérir quelques informations concernant l'hérédité de caractères différenciant les deux espèces et particulièrement ceux qui concernent la domestication ?

Matériels et méthodes

Les plantes sont cultivées dans les superserres du Phytotron de Gif-sur-Yvette et les caractères observés sont recensés et codés comme indiqué dans l'Annexe 1. Des études par électrophorèse de divers isozymes (estérases — peroxydases) ont été faites et seront plus précisément analysées dans un autre article de cette série (SANDMEIER *et al.*, article III en préparation).

Le codage des caractères quantitatifs permet d'intégrer les mesures et les observations qualitatives à l'aide des méthodes d'analyse des données (analyse des correspondances). Les familles F_2 étudiées sont issues des hybrides obtenus avec les lignées « 23 DB », « Ligui », « Massue » décrites et représentées sur les figures 7 et 9 de l'article I.

La sensibilité photopériodique pour la floraison de certaines plantes étudiées a nécessité des jours court artificiels de 12 heures après 102 jours de culture. (*P. mollissimum*, « 23 DB » et « Massue » sont sensibles à la photopériode, mais dans les conditions de culture de Gif en été, seul *P. mollissimum* exige des jours courts artificiels pour fleurir).

Chaque F_2 était initialement représentée par 54 plantes; les lignées « 23 DB », « Massue », « Ligui » et *P. mollissimum* étaient représentées par 6 à 10 plantes, les hybrides *P. mollissimum* × « 23 DB » et *P. mollissimum* × « Ligui » étaient représentés par 6 individus.

Les objectifs et les méthodes d'analyse statistique utilisés sont les suivants :

1. — analyse de la dispersion des familles F_2 pour l'ensemble des caractères : analyse des correspondances (BENZECRI, 1973) de l'ensemble des individus F_2 (les parents et les hybrides F_1 *molli* × « Ligui » et *molli* × « DB » sont projetés en variables supplémentaires); chaque famille sera graphiquement représentée par son ellipse de confiance au seuil 95 p. 100, les caractères sont codés comme l'indique l'annexe A_1.

2. — étude des liaisons entre caractères soit à partir de l'ensemble des plantes F_2 quand l'homogénéité des ségrégations le permettait, soit à partir de la seule famille F_2 (« Ligui ») : test χ^2 des tableaux de contingence. Ces liaisons peuvent être dues à l'existence de composants génétiques communs à plusieurs caractères, à la pléiotropie ou au linkage.

3. — étude comparée des variabilités intra famille : évaluation des variances génotypiques à partir des coordonnées de l'analyse des correspondances.

4. — appréciation de la valeur des caractères observés pour déterminer à quelle famille appartient chaque plante F_2 : analyse factorielle discriminante (ANDERSON, 1960) à partir des mesures elles-mêmes (non codées) des caractères quantitatifs (cf. annexe A_1).

Résultats

I. — *Désorganisation du développement de certaines plantes F_2*

Des plantes à développement anormal (quasi léthales ou sub-léthales) sont apparues dans chacune des F_2 (tabl. I). En aucun cas, ces plantes n'étaient susceptibles de fleurir, quelles que soient les conditions de longueur de jour. La proportion des plantes anormales est significativement différente d'une famille à l'autre.

TABLEAU 1

Nombre de plantes anormales, observées parmi 54 plantes pour chaque F_2

54 plantes F_2	« Massue »	« 23 DB »	« Ligui »
Plantes anormales	26	13	4

II. — *Analyse des correspondances*

L'analyse ne porte que sur les plantes ayant eu un développement normal. La figure 1 donne la représentation simultanée des 3 familles F_2, les parents et deux F_1 ont été projetés en variables supplémentaires. Les 5 axes étudiés permettent de décrire plus de la moitié de la variabilité d'ensemble (tabl. 2). Au delà du cinquième, l'inertie de chaque axe est inférieure à ce que représenterait chaque caractère pris individuellement.

a) *Signification des axes*

Le premier axe, approximativement (+ SFT-RGD-RGM-ETP), décrit un comportement floral. Aux valeurs négatives correspondent des plantes à floraison tardive et groupée, ayant beaucoup d'étages foliaires. Cette description est très analogue aux expressions coordonnées de la sensibilité à la photopériode (BELLIARD et PERNÈS, 1977). La famille « Ligui » est très groupée vers la zone d'insensibilité. Les ségrégations pour les deux autres familles sont beaucoup plus étalées sur l'ensemble de l'intervalle des deux parents. On appellera cette première composante : *axe de sensibilité photopériodique* (*).

Le deuxième axe décrit principalement des structures concernant l'épi en opposant aux formes cultivées les caractéristiques de la forme spontanée : épillets enveloppés, involucres à soies nombreuses, grains non colorés, égrenage spontané fort, rachis et pédoncule minces, faible remplissage des épis en autofécondation.

(*) La plupart des mils sont sensibles à la photopériode pour le déclenchement de leur floraison. Tant que la longueur du jour est supérieure au seuil permettant l'induction florale, la plante reste stationnaire dans son régime végétatif et accumule régulièrement des étages foliaires.

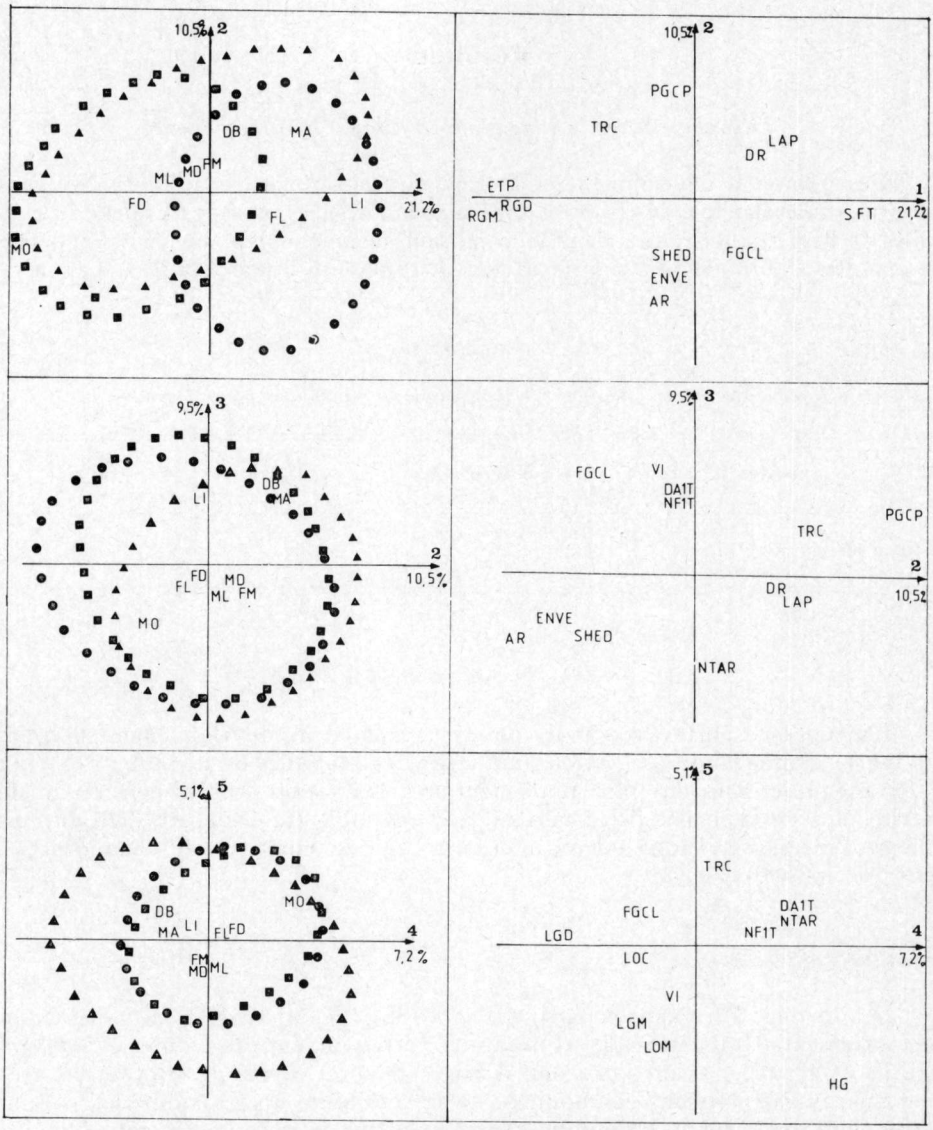


FIG. 1. — *Représentation sur le plan des axes 1,2 (fig. 1.a) et 2,3 (fig. 1.b) et 4,5 (fig. 1.c) des 3 familles F_2, dans une analyse de correspondances simultanée où les parents et F_1 sont projetés en variables supplémentaires.*

MO = *P. mollissimum ;* LI = « Ligui »; DB = « 23 DB »; MA = « Massue »;
ML = F_1 *molli* × « ligui »; MD = F_1 *molli* × « 23 DB »;
● = FL = F_2 *molli* × « Ligui »; ■ = FD = F_2 *molli* × « 23 DB »; ▲ = FM = F_2 *molli* × « Massue ».

On appellera cette deuxième composante : *axe de domestication pour les structures d'épi.*

Le troisième axe juxtapose des caractères du grain (vitrosité, coloration) et des caractéristiques du tallage (+ NF 1T + DA 1T — NTAR). On trouve dans

TABLEAU 2

Pourcentage d'inertie (A) des 5 premiers axes, coordonnées F et contributions CTR des caractères les plus déterminants dans chaque axe, pour l'analyse de correspondances simultanées des 3 F_2; parents et hybrides en variables supplémentaires.

	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Axe 4		Axe 5	
	$A_1 = 21,2$		$A_2 = 10,5$		$A^3 = 9,5$		$A^4 = 7,3$		$A^5 = 5,2$	
	1 F	CTR	2 F	CTR	3 F	CTR	4 F	CTR	5 F	CTR
FGCL			— 0,3	65	0,5	154	— 0,3	89		
CGC										
HG							0,6	187	— 0,6	291
LAG										
VI					— 0,5	156			— 0,2	63
SHED			— 0,4	56						
ENVE			— 0,5	107						
AR			— 0,7	158						
PTGP										
PCG										
PGCP			1,2	256						
TRC			0,3	83					0,4	144
NEP										
DR			0,3	55						
LAP			0,3	58						
LDP										
LOC							0,3	55		
LAC										
PP										
NTAR					— 0,4	122	0,4	109		
RGD	— 0,9	116								
RGM	— 1,	193								
LOD										
LAD										
LOM									— 0,5	111
LAM										
LGM							0,3	52	— 0,4	85
LGD							— 0,7	210		
HAM										
DA_1T					0,4	67	0,3	78		
ETP	— 0,9	124								
SFT	+ 0,7	79								
NF_1T					0,4	102	0,2	42		
DT										
LEM										

Les 3 F_2 ensemble (parents et hybrides éléments supplémentaires).

Autres caractères : axe 1 : CTR $\leqslant$ 46
axe 2 : CTR $\leqslant$ 37
axe 3 : CTR $\leqslant$ 40
axe 4 : CTR $\leqslant$ 25
axe 5 : CTR $\leqslant$ 37

le sens positif les plantes de type cultivé dont le tallage, de type basal, est mis en place tardivement. Ces combinaisons opposent encore nettement les formes cultivées et spontanées.

Désignons cette troisième composante : *axe de domestication pour l'organisa-*

tion du tallage et le caractère du grain. Les associations de caractères des quatrième et cinquième axes n'ont pas la même clarté.

b) *Position des parents et F_1; examen des ellipses de confiance* (fig. 1)

Les parents et F_1 n'ont pas contribué à la définition des axes puisqu'ils sont projetés en variables supplémentaires. Ils sont situés par les 3 premiers axes de façon très conforme aux prévisions déduites de la signification des axes. Les parents sont à la périphérie des ellipses de confiance qui les englobent. Les F_1 sont toujours centrales. Une seule exception concerne la famille F_2 « Ligui » sur l'axe 1 : « Ligui » et la F_1 sont à la périphérie du nuage, qui ne contient pas *mollissimum.*

Il n'y a pas de liaisons entre les groupes de caractères définis par chaque axe puisque les corrélations entre coordonnées des individus sont nulles ou faibles dans chacune des familles F_2 : aucune corrélation significative pour la famille « Ligui », 2 corrélations significatives pour « 23 DB » (0,42 entre les axes 1 et 3 et 0,32 entre les axes 4 et 5), 1 corrélation significative pour « Massue » (0,48 entre les axes 1 et 2).

Les ellipses de confiance des familles F_2, « 23 DB » et « Ligui » sont de dimensions très comparables. Les ellipses de la famille F_2 « Massue » pour les plans (1, 2) et (4, 5) sont nettement plus étendues, pourtant la position du parent « Massue » n'est pas particulièrement excentrique.

III. — *Liaisons entre caractères*

La représentation globale des 3 familles F_2 souligne l'importance de quelques ensembles de caractères. Mais d'autres caractères peuvent être masqués du fait de leurs corrélations avec les plus déterminants de l'analyse factorielle. D'où l'analyse de contrôle ci-dessous.

a) *Caractères dont les ségrégations sont homogènes dans les 3 F_2*

Les texts d'homogénéité (χ^2) permettent de considérer les 3 F_2 comme un ensemble homogène pour les ségrégations de 13 caractères dont les niveaux de signification des liaisons sont rapportés dans le tableau 3.

Ces caractères se regroupent ainsi :

— dimension des organes du dernier entre-nœud (longueur de la gaine et du limbe du drapeau, du pédoncule et de la chandelle),

— dimension du grain (forme, largeur, poids de 100 grains),

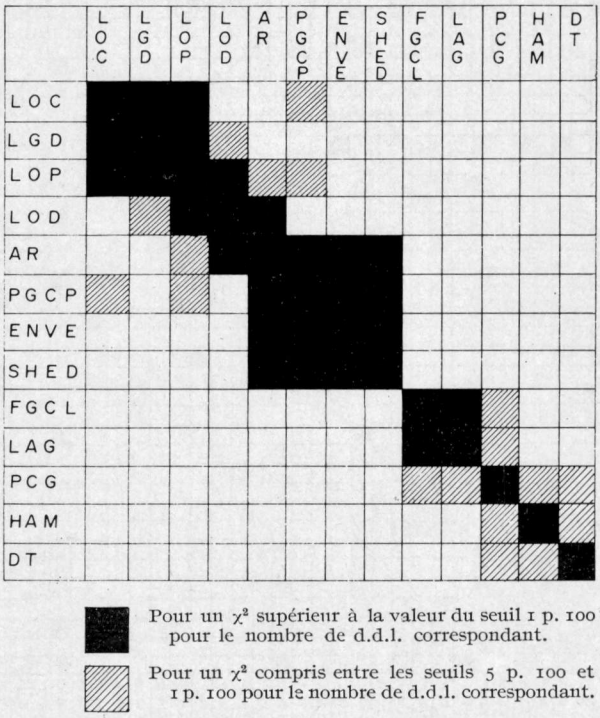
— hauteur à maturité et diamètre de la tige,

— propriétés de l'épillet (soies, pédicelle, enveloppes, autofertilité).

Leur cohésion interne et leur indépendance relative sont remarquables.

TABLEAU 3

Niveaux de signification du test χ^2 d'indépendance des caractères dont les ségrégations étaient homogènes pour les 3 familles



b) *Liaisons entre caractères dans la famille F_2 « Ligui »*

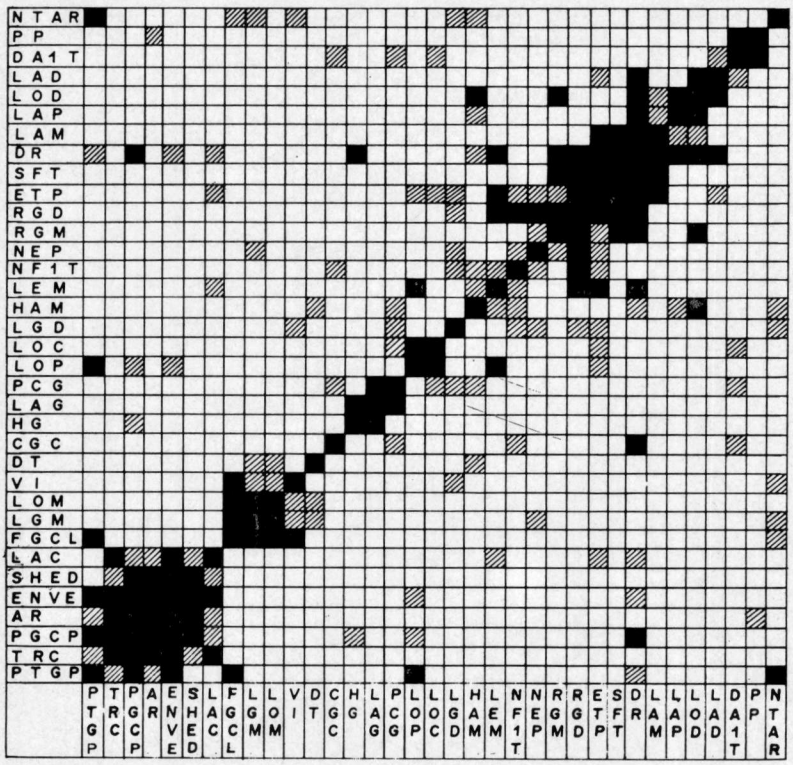
Le tableau 4 met en évidence deux grands ensembles de liaisons et plusieurs petites associations plus dispersées.

1. Le premier ensemble contient des caractères d'épillet opposant le type « cultivé » au type « spontané » (voir axe 2).

Forme spontanée	Forme cultivée	Désignation
« égrenage spontané » absence de pédicelle	résistance à l'égrenage présence de pédicelle	SHED
soies de l'involucre abondantes et longues	soie rares et courtes	AR
enveloppes (glumes et glumelles) longues	enveloppes courtes (graines nues)	ENVE
austostérilité (peu de graines obtenues sous sac, en autofécondation)	autofertilité (graines obtenues sous sac)	PGCP

TABLEAU 4

Niveaux de signification du test χ^2 d'indépendance pour tous les caractères en ségrégation dans la famille « Ligui »



■ Pour un χ^2 supérieur à la valeur du seuil 1 p. 100 pour le nombre de d.d.l. correspondant.

▨ Pour un χ^2 compris entre les seuils 5 p. 100 et 1 p. 100 pour le nombre de d.d.l. correspondant.

Les tableaux de ségrégation des différents états de ces caractères ne sont pas incompatibles avec des ségrégations mendéliennes pour un locus chacun; tout se passe comme s'ils appartenaient à un même groupe de linkage, (marqué également par un locus estérase cf. Article III).

2. Le deuxième ensemble de caractères exprime différents aspects de la floraison, dans son déclenchement photopériodique (voir axe 1). Les différentes mesures effectuées pourraient être au moins partiellement le reflet pléiotropique des ségrégations du gène I (BELLIARD *et al.*, 1979). L'incidence de ce contrôle de l'induction florale sur divers aspects du développement de la plante s'exprime par la diversité des liaisons observées.

Hors de ces deux grands ensembles, indépendants l'un de l'autre, d'autres associations concernent *certains aspects du grain* ((forme, vitrosité), (hauteur, longueur, poids)) et des *composantes du dernier entre-nœud* ((longueur, largeur du drapeau, diamètre du rachis, longueur du pédoncule), (largeur du pédoncule, longueur de la chandelle)).

IV. — *Variances génotypiques des familles F_2*

Le tableau 5 donne une estimation des variances génotypiques V_G pour chaque combinaison de caractères définissant chaque axe et pour chaque famille F_2, en extrayant de la variance phénotypique intra-familles V_p une variance résiduelle

TABLEAU 5

Variance génotypique intra familles VG_L, VG_M, VG_D pour « Ligui », « Massue », « 23 DB » respectivement et variances résiduelles V_E (calculées d'après les familles parentales « Ligui », « 23 DB », « Massue », mollissimum et F_1 molli × « 23 DB », molli × « Ligui ») pour les coordonnées dans chacun des 5 axes de l'analyse des correspondances.

	d.l.	1	2	3	4	5
VG_L	46	(***) 28 169,078	(***) 57 194,024	(***) 46 186,896	(***) 25 258,951	(**) 17 631,775
VG_D	40	(***) 42 736,654	(***) 40 386,849	(***) 53 969,140	(***) 25 593,476	(*) 14 839,542
VG_M	26	(***) 84 711,008	(***) 41 628,726	(***) 50 554,429	(***) 70 527,253	(**) 34 686,980
$V_{résiduelle}$	16	7 315,37	7 471,36	5 148,74	5 462,41	9 645,29

(***) 1 p. 1000
(**) 1 p. 100 niveaux de signification des tests F pour les rapports : $\frac{V_G + V_E}{V_E}$
(*) 5 p. 100

V_E estimée par la moyenne des variances intra-familles qui étaient statistiquement homogènes (*mollissimum*, « Ligui », « 23 DB », « Massue », F_1 « 23 DB », F_1 « Ligui »).

Les variances génotypiques observées sont élevées, elles diminuent notablement pour les familles F_2 « Ligui » et F_2 « 23 DB » à partir des axes 4 et 5. Le tableau 6 souligne la supériorité des variances génotypiques de la famille F_2 « Massue ».

TABLEAU 6

Classement des variances génotypiques pour chaque axe (seuil 1 p. 100)

Axe 1 . . .	$V_M > V_D = V_L$
Axe 2 . . .	$V_M = V_D = V_L$
Axe 3 . . .	$V_M = V_D = V_L$
Axe 4 . . .	$V_M > V_D = V_L$
Axe 5 . . .	$V_M > V_D = V_L$

V_M, V_D, V_L variance génotype des F_2 « Massue », « 23 DB », « Ligui » respectivement.

V. — *Discrimination des 3 familles F_2*

Les fortes superpositions des ellipses de confiance (fig. 1) montrent que l'analyse des correspondances affiche d'avantage les variabilités intra-famille et leurs étirements dans le sens parent spontané *mollissimum*-parents cultivés que les variations inter-familles. Cependant, une analyse factorielle discriminante sur les caractères observés permet de séparer parfaitement les trois familles l'une par rapport à l'autre. L'analyse en composantes principales des mesures introduites dans l'analyse discriminante ne sépare pas davantage les familles que l'analyse des

TABLEAU 7

Nombre d'individus de chaque famille correctement classés ou attribués aux autres familles d'après l'analyse discriminante effectuée sur les mesures des caractères marqués d'un astérisque dans l'Annexe 1.

Nb d'individus étant \ Classé comme	« Massue »	« Ligui »	« 23 DB »	% de bonne classification
« Massue »	17	4	0	81
« Ligui »	4	27	1	84,4
« 23 DB »	0	1	43	97,7
Total	21	32	44	89,7

correspondances; la description d'ensemble (47 p. 100 d'inertie en trois axes) met aussi l'accent sur l'étirement des F_2 dans le sens sauvage-cultivé (plan 1,3); l'axe 2 souligne un déplacement dans le sens des fortes vigueurs dont peuvent témoigner les F_2 (figures Annexe 2).

La figure 2 donne des représentations et les coupures réalisées à partir des mesures (voir Annexe 1 : caractères notés d'une astérisque). Les classifications obtenues sont données dans le tableau 7. L'adjonction des observations qualitatives ne laisse plus subsister qu'une seule plante F_2 mal classée.

Conclusions

L'analyse de ces 3 familles F_2 apporte les informations suivantes :

1. De larges recombinaisons entre *P. mollissimum* Hochst et des formes cultivées très variées de *P. americanum* (L.) Leeke, peuvent être réalisées, avec des plantes viables et fertiles, normalement développées, comme l'indique l'étendue et la dispersion des ellipses représentatives des familles F_2.

2. Une des lignées (« Massue ») paraît notablement plus différente de *P. mollissimum* que les 2 autres lignées : fraction importante de plantes anormales, variances génotypiques F_2 plus élevées.

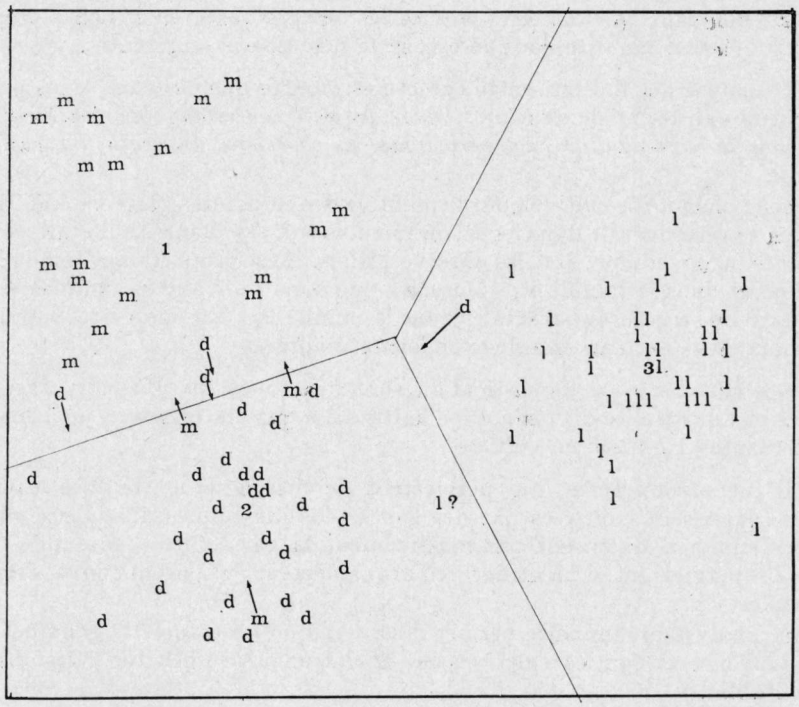


FIG. 2. — *Analyse discriminante des 3 familles F_2, sur les caractères quantitatifs dont les plus discriminants sont indiqués ci-dessous.* Le complément de positionnement des points mal classés est décrit par des flèches à l'aide des caractères précisés ci-dessous.

La position d'un seul individu reste ambigue (issu de « 23 DB » ou de « Ligui »?).
Les caractères discriminants sont dans l'ordre :
RGM, LGD, LAD, LOD, DT, DR, NF_1T, LOC, LEM, PP.

MAL classes	Caractères qualitatifs permettant de les classer		
	Forme grain	Couleur grain	Enzymes
FM 35		marron (« Massue »)	EMA
FM 46		marron	
FM 54		marron	
FD2.	globuleux (23 DB)	grain clair	EDB
FD21		grain clair	EDB
FD31	ovoïde pyramidal		
FD34	globuleux	grain clair	EDB
FL54	non identifiable		

3. Le commentaire suivant s'appuie sur le fait que d'une manière générale, dans les situations additives ou à dominance intermédiaire, moins il y a d'unités en ségrégation plus le nuage F_2 tend à couvrir l'intervalle entre les parents. Il semble ainsi qu'une grande partie de la variabilité totale, décrite par les premiers axes puisse être expliquée par la ségrégation d'un *nombre réduit de complexes de*

gènes liés ; pourtant 35 caractères très variés ont été observés et l'on a croisé des plantes que le taxonomiste considère comme des espèces différentes.

4. L'analyse des liaisons entre caractères montre que ces complexes peuvent être identifiés en terme de *structures biologiquement cohérentes :* les *structures d'épi, l'expression de la sensibilité photopériodique, les caractères du grain, l'organisation de tallage.*

Ainsi le phénotype cultivé pour l'ensemble des caractères (SHED, AR, ENVE, PGCP) ne se retrouverait dans les F_2 qu'une fois sur 115 plantes s'il était contrôlé par 4 gènes indépendants. Il a été observé 14 fois. Il est proportionnellement 3 fois plus fréquent dans la famille F_2 « Massue » que dans les 2 autres familles F_2. Cet excès relatif de structures parentales dans la famille F_2 « Massue » est à rapprocher de son taux élevé de plantes à développement anormal.

5. Les caractères de domestication sont distribués sur plusieurs axes indépendants et l'intégralité du phénotype cultivé n'a pas été retrouvé sur l'ensemble des 162 plantes F_2 mises en culture.

6. D'autres caractères, qui permettent de distinguer entre elles les lignées cultivées, paraissent contrôlés par des gènes plus disséminés dans l'ensemble du génome. Ceux-ci n'organisent pas massivement la variabilité d'ensemble des F_2 bien qu'ils permettent d'identifier remarquablement le parent dont est issue chaque plante F_2.

Cette analyse préliminaire permet d'assurer que les transferts géniques entre formes sauvages et formes cultivées ne devraient pas se heurter à des obstacles insurmontables.

On voit qu'il est possible d'envisager d'utiliser le polymorphisme des formes sauvages dans son ensemble et non pas, comme il est généralement fait, exploiter exclusivement quelques systèmes génétiques à déterminisme mendélien simple conférant une résistance très spécifique ou une aptitude particulière. On pourrait ainsi envisager l'utilisation des formes sauvages pour l'acquisition de propriétés adaptatives assez générales liées à un polymorphisme d'ensemble que l'on pourrait simplement « habiller » de la livrée des caractères de domestication.

On pourrait ainsi imaginer que l'amélioration des plantes échappe à la fatalité des « transferts ponctuels » et retrouve opérationnellement la notion d'adaptation ou de tolérance comme caractère d'une population polymorphe et non comme la propriété de génotypes uniques.

Dans ce cadre de réflexion, il est important de noter que la différenciation des deux formes spontanée et cultivée du Mil semble associée seulement à quelques complexes de gènes. Leur étude approfondie permettra de préciser le processus de la domestication chez le Mil et de maîtriser l'utilisation des formes sauvages tant dans des programmes de conservation dynamique des ressources génétiques (PERNÈS, 1979) que dans des stratégies nouvelles d'amélioration des plantes.

Reçu pour publication en janvier 1980.

Summary

Genetic analysis of the relationships between spontaneous and cultivated forms of Pearl millet

II. *Study of* 3 F_2 *families from different* F_1 *hybrids* P. mollissimum × P. americanum

Three F_2 families studied came from hybrids between a spontaneous *P. mollissimum* and three *P. americanum* cultivated lines (« 23 DB », « Massue », « Ligui »). Multivariate analyses of 35 characters allow to study the occurence of recombinations between wild and domesticated genomes in Pearl millet. The segregations of characters and their correlations are also described. Neither absolute reproduction barrier nor complete inviability do occur. Gene exchanges look easy between these wild and cultivated plants. Genetic distance between « Massue » and the wild seems higher than these with (« 23 DB », « Ligui »). From these results some aspects of domestication process can be suggested.

Références bibliographiques

ANDERSON T. W., 1960. *An introduction to multivariate statistical analysis.* John Wiley and sons. INC. New-York. London.

BELLIARD J., PERNÈS J., 1977. Étude de l'organisation génétique et physiologique d'une barrière reproductive particulière chez le Mil : contrôle photopériodique de la floraison. *Physiol. vég.*, **15** (3), 551-545.

BELLIARD J., PERNÈS J., SANDMEIER M., 1979. Les différentes phases du développement chez le Mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubbard) et la recherche de marqueurs. *Physiol. vég.*, **17** (2), 387-397.

BELLIARD J., NGUYEN VAN E., PERNÈS J., 1980. Analyse des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle. I. — Étude des parents et hybrides de première génération (F_2) entre un écotype de *Pennisetum mollissimum* Hochst. (forme spontanée) et différentes formes cultivées de *Pennisetum americanum.* (L.), Leeke. *Ann. Amélior. Plantes*, **30** (3), 229-251.

BENZECRI J. P., 1973. *L'analyse des données tome I. « la taxonomie ». Tome II « l'analyse des correspondance »*». Dunod, Paris.

PERNÈS J., 1979. Les populations des formes spontanées, système adaptateur des variétés traditionnelles aux écosystèmes cultivés. Importance pour les ressources génétiques des plantes. *Journées « Écologie et développement »*. (sous presse).

Annexe 1

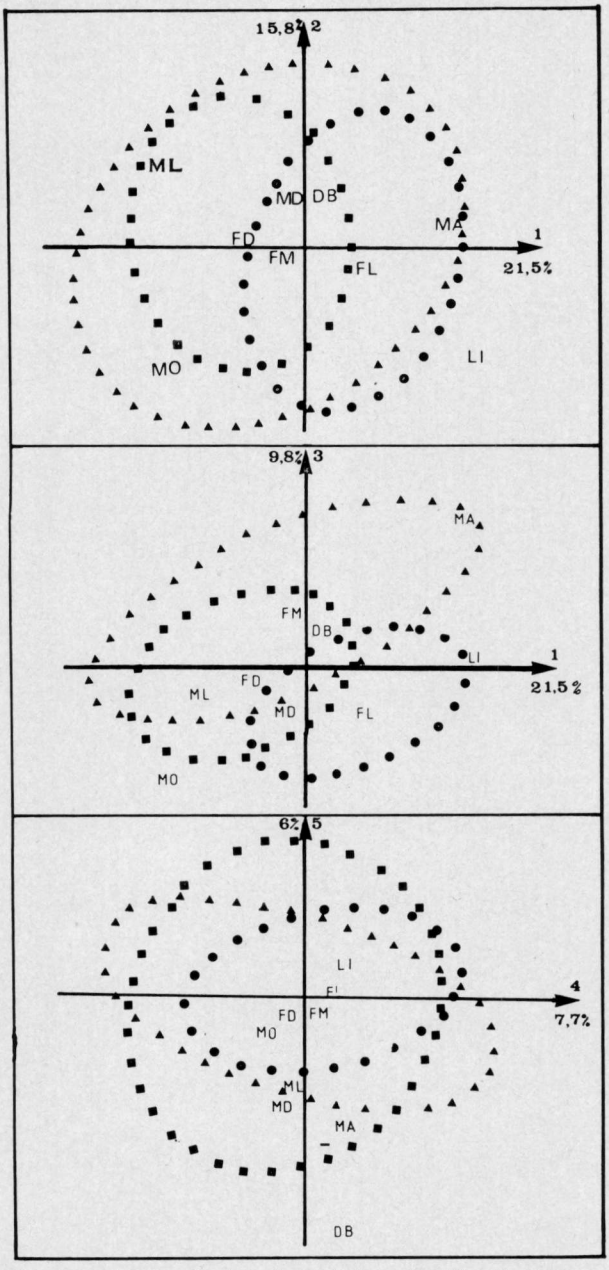
		Caractères	Libellé	États possibles	
Description de la chandelle		LOC*	longueur chandelle	0	⩽ 12 cm
				1	< 12 cm
		LAC*	diamètre chandelle	0	⩽ 14 mm
				1	de 15 à 30 mm
				2	> 30 mm
		LOP*	longueur du pédoncule de la chandelle	0	⩽ 14 cm
				1	de 15 à 28 cm
				2	> 28 cm
		LAP*	largeur du pédoncule de la chandelle	0	⩽ 2 mm
				1	de 3 à 5 mm
				2	> 5 mm
		DR*	diamètre rachis	0	< 1,5 mm
				1	de 1,5 à 2 mm
					> 2 mm
		SHED	shedding	0	absence
				1	présence
		AR	aristation	0	non
				1	oui
FEUILLES	*Drapeau*	LOD*	longueur	0 courte	⩽ 35 cm
				1 longue	> 35 cm
		LAD*	largeur	0 étroite	⩽ 26 mm
				1 large	> 26 mm
		LGD*	longueur de sa gaine	0 courte	⩽ 15 cm
				1 longue	> 15 cm
		RGD*	rang de la feuille	0 faible	⩽ 21
				1 élève	> 21
	La plus grande feuille	LOM*	longueur	0 courte	⩾ 76 cm
				1 longue	< 76 cm
		LAM*	largeur	0 étroite	⩾ 25 mm
				1 large	< 25 mm
		LGM*	longueur de sa gaine	0 courte	⩾ 12 cm
				1 longue	< 12 cm
		RGM*	rang de la feuille	0 faible	⩾ 13
				1 de 14 à	19
				2 élevé	< 19

		Caractères	Libellé	États possibles
Rythme d'émission des feuilles		PP*	pente de la courbe d'émission des feuilles sur la talle principale	0 lent < 0,25 1 de 0,25 à 0,29 2 rapide > 0,29
Tige principale		DT*	diamètre tige principale	0 tige mince ⩽ 8 mm 1 grosse tige > 9 mm
		LEM*	longueur de l'entre nœud de la feuille la plus grande	0 court > 10 cm 1 de 10 à 20 cm 2 long > 20 cm
		HAM*	hauteur de la tige principale à maturité (chandelle comprise)	0 > 1,50 m 1 1,50 m à 3,50 m 2 > 3,50 m
DESCRIPTION DU GRAIN	Composantes du grain	FGCL	forme du grain	0 ovoide (Molli) 1 intermédiaire 2 forme cultivée
		CGC	couleur du grain	0 jaune clair (Molli) 1 gris clair ou marron clair 2 gris ou marron foncé
		VI	vitrosité	0 vitreux (Molli) 1 intermédiaire (Ligui) 2 farineux (Massue 23 DB)
		ENVE	présence d'une enveloppe autour du grain	0 grain nu (cultivé) 1 grain complètement enveloppé
		HG*	hauteur du grain	0 < 2 mm 1 de 2 à 3 mm 2 > 3 mm
		LAG*	largeur du grain	0 < 2 mm 1 de 2 à 3 mm 2 > 3 mm
		PCG*	poids de cent grains	0 (Molli) < 200 mg 1 (Ligui-23 DB) de 20 mg à 450 mg 2 (Massue) > 450 mg
	Composantes du rendement	PTGP*	poids total de grains par plante	0 < 1 gr 1 1 à 10 gr 2 10 à 50 gr 3 > 50 gr
		PCGP (AF)*	poids de grains sur la chandelle principale en AF	0 auto stérile < 1 gr 1 auto fertile > 1 gr
		TRC*	taux de remplissage de la chandelle = rapport entre poids grains en AF et poids de la chandelle	0 < 10 % 1 10 à 50 % 2 > 50 %
		NEP*	nombre d'épis par plante	0 < 10 1 10 à 50 2 > 50

	Caractères	Libellé	États possibles
Tallage	NTAR	note de tallage aérien	0 pas 1 peu 2 beaucoup
Précocité	ETP*	date épiaison talle principale	0 précoce (insensible LJ) ⩽ 100 j 1 tardif (insensible LJ) > 100 j
	DA1T*	date début tallage	0 précoce < 29 j 1 de 29 à 33 j 2 tardif > 33 j
	NF1T*	nombre de feuilles sur la talle principale quand la 1re talle primaire apparait	0 peu de feuilles < 6 feuilles 1 7 feuilles 2 beaucoup de feuilles et plus > 8 feuilles
	SFT*	étalement de la floraison	0 groupée < 8 jours 1 étalée < 9 jours et plus

* Caractères dont les mesures elles-mêmes ont été utilisées pour l'analyse discriminante (fig. 2) et l'analyse en composante principale (Annexe 2).

Annexe 2



Représentation sur les plans des axes (1,2) (1,3), (4,5) des 3 familles F_2 dans une analyse de composantes principales simultanée où parents et F_1 sont projetées en variables supplémentaires pour les variables quantitatives prises compte dans l'analyse discriminante décrite (fig. 2).

MO = *P. mollissimum ;* LI = « Ligui »; DB = « 23 DB »; MA = « Massue »;
ML = F_1 *molli* × « Ligui »; MD = F_1 *molli* × « 23 DB »;
● = FL = F_2 *molli* × « Ligui »; ■ = FD = F_2 *molli* × « 23 DB »; ▲ = FM = F_2 *molli* × « Massue »

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 271-284.

Technique d'étude en semi *in situ* des relations style-pollen chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.)

A. ABDELKEFI (*)

Laboratoire de Zoologie,
École Normale Supérieure,
46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex *05*

Résumé

La germination du pollen sur le stigmate et la phase de croissance pollinique à travers le style définissent les relations « style-pollen » et représentent un des conditionnements de la fertilité.

Une technique a été mise au point pour étudier, chez la Luzerne, les relations style-pollen en semi *in situ :* après la pollinisation, les fleurs sont disséquées et les styles sont excisés au niveau du deuxième ovule. Après un temps d'incubation, les styles excisés présentant des tubes polliniques à leur base sont dénombrés et leur fréquence calculée sur un échantillon de 50 styles excisés par autofécondation ou croisement (sans castration) représente l'indice de mesure des relations style-pollen en semi *in situ*. La nécessité de maintenir deux ovules à la base du style, pour voir des tubes polliniques émerger, suggère l'hypothèse d'un rôle actif des ovules sur la croissance pollinique d'autant plus qu'aucune sortie de tubes polliniques n'est observée si l'excision est pratiquée à la base du style avant le premier ovule.

L'étude des relations « style-autopollen » et l'analyse de l'autofertilité *in vivo* ont montré respectivement une importante variabilité entre les dix familles d'hybrides simples étudiées.

Les analyses statistiques montrent que ces deux types de mesure de la productivité d'une autofécondation ne diffèrent pas de façon significative : l'autopermissivité, définissant les relations style-autopollen en semi *in situ*, et l'autofertilité *in vivo* peuvent être considérées comme deux estimations équivalentes du même caractère.

La technique des styles excisés fournit un moyen pratique et rapide pour obtenir une estimation de l'autofertilité.

Introduction

La Luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) présente une grande gamme d'autofertilité, bien que son régime de reproduction soit allogame.

Divers mécanismes, bien connus, liés à la biologie florale de la Luzerne, favo-

(*) Adresse actuelle : Laboratoire de Génétique et Biométrie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, Le Belvédère, Tunis.

risent le maintien de l'hétérozygotie de la plante, malgré l'existence de ce double mode de reproduction.

Dès le déclenchement de la fleur, la barrière mécanique à l'autofécondation se trouve levée et le stigmate devient réceptif, les grains de pollen germent et développent des tubes polliniques qui peuvent traverser les tissus conducteurs du style en direction de l'ovaire. Cependant une importante compétition en faveur de l'allopollen privilégie les fécondations croisées (DEMARLY, 1963).

Les relations « style-pollen », caractérisées par la germination du pollen sur le stigmate et l'élongation des tubes polliniques à travers les tissus femelles intervenant juste après une auto- ou une allopollinisation, apparaissent comme un des conditionnements importants de la fertilité.

Une technique d'étude des relations « style-pollen », susceptible d'apporter des renseignements sur l'avantage sélectif de l'allopollen et sur le comportement de l'autopollen placé seul sur le stigmate, a été mise au point.

La technique des styles excisés, décrite par plusieurs auteurs, permet de préciser les rapports entre le gamétophyte mâle et la partie femelle du sporophyte.

La technique de « greffe » sur styles excisés d'*Oenothera organensis* utilisée par EMERSON (1940) reprise et remaniée par HECHT (1960) a permis de mieux localiser la réponse d'incompatibilité gamétophytique chez cette espèce. KWACK (1965) précise les conditions de culture des styles excisés d'*Oenothera organensis* et étudie par cette méthode l'influence de différents traitements artificiels dans la manifestation d'incompatibilité. BREWBAKER (1961) fait varier le niveau d'excision pour déterminer la zone d'incompatibilité chez *Petunia inflata*. Par cette même technique, chez *Lilium longiflorum*, ASCHER *et al.* (1966) mesurent en fonction de l'âge physiologique de la fleur, la croissance des tubes polliniques compatibles et incompatibles à travers le style. KENDALL (1968) étudie chez *Trifolium pratense* le comportement du pollen compatible et incompatible sur styles excisés.

L'étude des relations style-pollen par la méthode semi *in situ* chez *Medicago sativa* L. ne vise pas tout à fait les mêmes objectifs. Le but principal est d'étudier les modalités de la compétition entre l'auto- et l'allopollen et d'analyser les conséquences de la phase de croissance pollinique dans le style sur la productivité en gousses ou en graines après une autofécondation ou un croisement (ABDELKEFI, 1978).

Nous présenterons ici la mise au point de la technique qui n'avait pas encore été appliquée à la Luzerne et nous comparerons les mesures de la productivité de l'autofécondation *in vivo* et en semi *in situ*.

Matériel et méthodes

I. — *Mise au point de la technique semi* in situ

A. — *Conditions de culture des styles excisés*

1) *Pollinisation et dissection de la fleur*

La fleur pollinisée est disséquée sous une loupe binoculaire. Après avoir retiré le pistil et choisi un niveau de coupe, l'ensemble stigmate-style est séparé du reste du pistil et les styles excisés sont déposés sur le bord d'une lame recouverte d'un

milieu de culture gélifié. Les autofécondations ou les croisements sont faits exactement de la même manière que sur la plante entière. Après la dissection de la fleur et malgré sa manipulation, le stigmate reste encore couvert de pollen, car dès la rupture de la membrane stigmatique des sécrétions liquides favorisent la rétention du pollen.

2) *Milieu de culture*

Le milieu de culture retenu est composé de 100 ppm d'acide borique, 2 000 ppm de nitrate de calcium, 1 p. 100 d'agar et 10 p. 100 de saccharose par litre d'eau distillée.

Le milieu, encore liquide, est coulée dans un récipient à fond plat recouvert de lames de verre, et les préparations sont découpées en suivant le contour des lames après la gélification du milieu.

Chaque lame recouverte du milieu gélosé est placée sur un support plastique dans une boîte de Petri dont le fond est recouvert d'une feuille de papier filtre imbibée d'eau afin de maintenir dans la boîte un taux d'hygrométrie proche de la saturation.

3) *Conditions de culture*

Des pistils entiers auto- ou allopollinisés déposés sur ce milieu ont été placés durant trois jours dans une étuve obscure à $26^0 \pm 1\ ^0C$ (fig. 1). Ce délai passé, des ovules fécondés en voie de développement peuvent être observés après dissection des ovaires. Le milieu retenu semble donc favorable à l'entretien et la survie des tissus femelles pendant quelques jours, et les conditions de température ainsi que l'obscurité propices à la germination du pollen et à l'élongation des tubes polliniques à travers les tissus femelles.

B. — *Choix du niveau de l'excision — Indice de mesure*

Si une excision est pratiquée, après une auto-ou une allopollinisation, à la base du style avant le premier ovule, les fréquences de styles excisés présentant des tubes polliniques à leur base sont très faibles et peu variables (de 0 à 0,1) quelque soit le temps d'incubation (fig. 2).

En revanche, après avoir sectionné le pistil à deux millimètres (2 mm) environ de la base du stigmate, les fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques, trois heures après la mise en culture, varient de 0,8 à 1, quelque soit le mode de pollinisation : autofécondation ou croisement. Cette opération répétée plusieurs fois sur différentes structures génétiques (hybrides simples, hybrides doubles et inbred ainsi que sur 2 individus diploïdes) a toujours fourni le même résultat (tabl. 1 et 2).

L'absence de variabilité des fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques pour ces deux niveaux d'excision ne permet donc pas l'étude quantitative des relations style-pollen. Cependant, lorsque l'excision est pratiquée à la base du deuxième ovule, les fréquences de styles traversés par des tubes polliniques, après cinq heures de mise en culture, sont variables selon les génotypes et répétables d'une préparation à l'autre pour le même individu quelque soit le mode de pollinisation (tabl. 3 et 4).

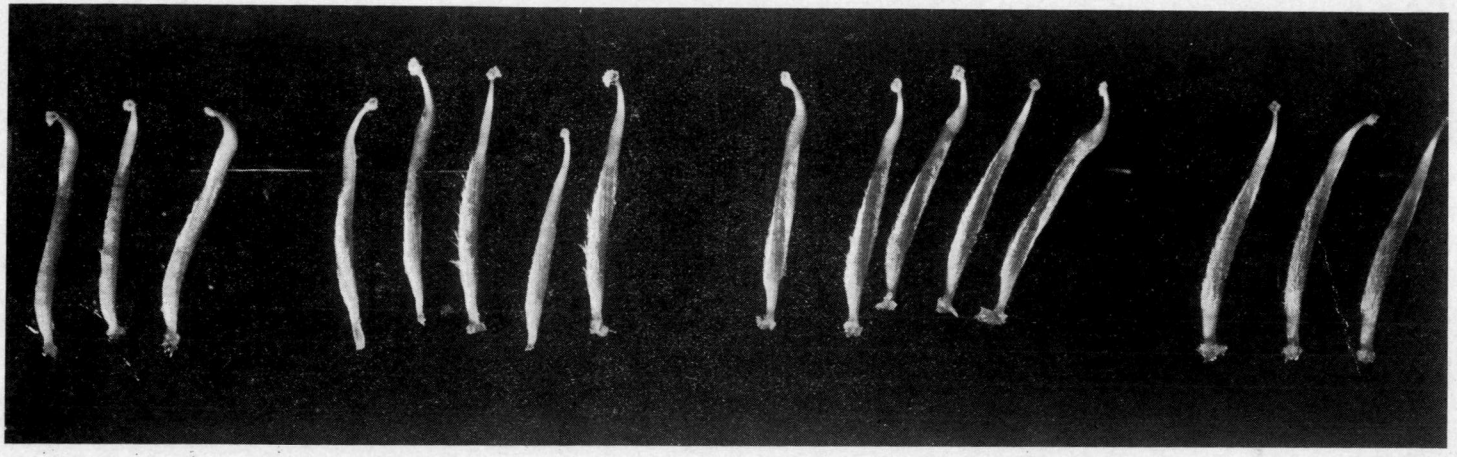


FIG. 1. — *Photographie de pistils entiers autopollinisés déposés sur le bord d'une lame recouverte du milieu de culture « semi in situ »* (× 3,6).

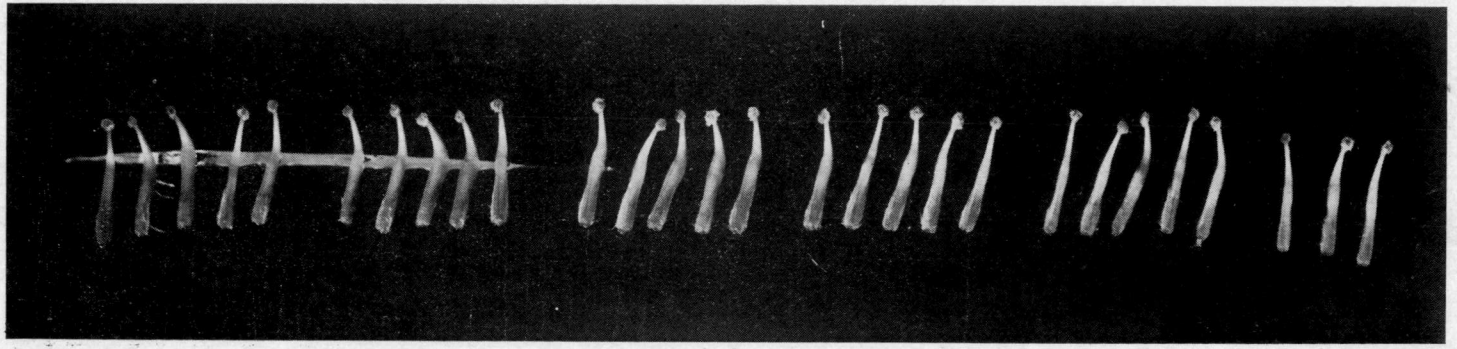


FIG. 3. — *Photographie de styles excisés autopollinisés* (× 3,6). *Vue d'ensemble d'une préparation.*

a) pistil entier

b) style excisé à la base du stigmate

Les fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques varient de 0,8 à 1 quelque soit le mode de pollinisation

c) style excisé avant le 1er ovule

Les fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques sont peu variables et très faibles (0 à 0,1) quelque soit le mode de pollinisation

d) style excisé au niveau du 2e ovule

La fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques après 5 h. d'incubation est caractéristique du génotype

FIG. 2. — *Étude des relations style-pollen en semi* in situ. *Technique des styles excisés. Différents niveaux d'excision.*

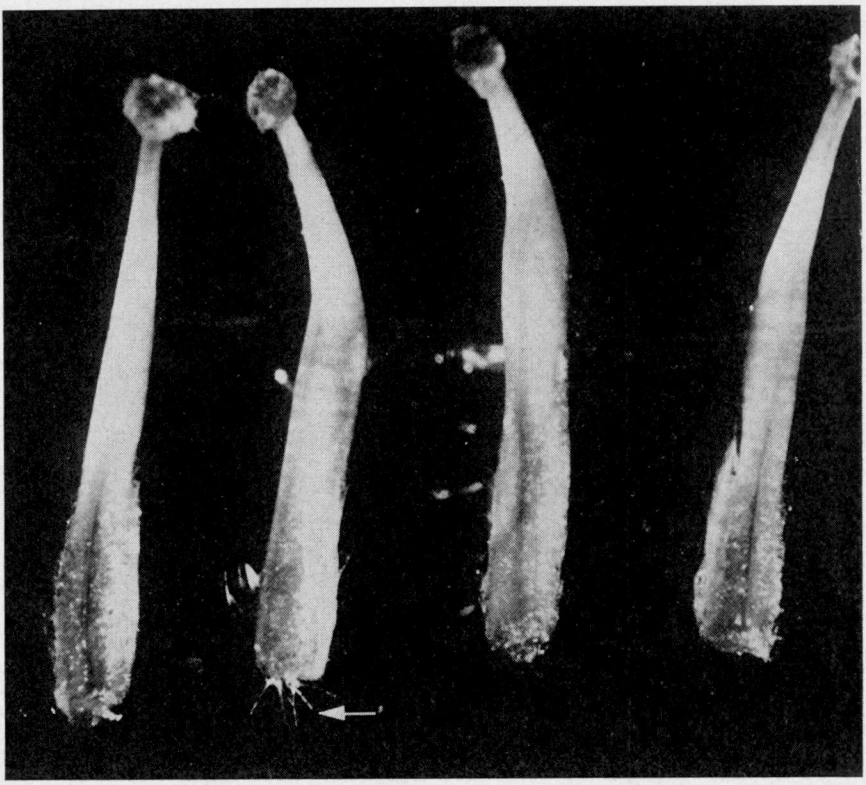


FIG. 4. — *Photographie de styles excisés autopollinisés* (× 20) → *tubes polliniques.*

TABLEAU 1

Relations style-pollen en autopollinisation. Fréquences de styles excisés à deux millimètres de la base du stigmate présentant des tubes polliniques au niveau de l'excision. (Coupes courtes.)

Génotypes	1re Répétition	2e Répétition
HS_{IV}	$\frac{32}{39} = 0,82$	$\frac{30}{35} = 0,85$
HS_{V}	$\frac{25}{29} = 0,86$	$\frac{27}{32} = 0,84$
II_3	$\frac{24}{30} = 0,93$	
III_1	$\frac{25}{30} = 0,83$	
X_1	$\frac{28}{30} = 0,93$	
X_3	$\frac{24}{31} = 0,77$	
HD_I	$\frac{21}{21} = 1,00$	$\frac{28}{29} = 0,96$
HD_{IV}	$\frac{32}{34} = 0,94$	$\frac{37}{40} = 0,92$
I_{III}	$\frac{29}{36} = 0,80$	$\frac{33}{40} = 0,82$
I_{VI}	$\frac{31}{38} = 0,81$	$\frac{24}{31} = 0,77$
$9b$	$\frac{29}{32} = 0,90$	$\frac{32}{35} = 0,91$
$11b$	$\frac{43}{45} = 0,95$	$\frac{48}{50} = 0,96$

TABLEAU 2

Relations style-pollen en allopollinisation. Fréquences de styles excisés à deux millimètres de la base du stigmate présentant des tubes polliniques au niveau de l'excision. (Coupes courtes.)

Structures génétiques	Croisements ♀ × ♂	Fréquences
Hybrides simples $4n$	$HS_V \times HS_{VI}$	$\frac{30}{35} = 0,85$
	$III_1 \times X_1$	$\frac{28}{30} = 0,93$
	$X_3 \times II_3$	$\frac{29}{30} = 0,96$
Hybrides doubles $4n$	$HD_I \times HD_{IV}$	$\frac{31}{35} = 0,88$
Inbred $4n$	$I_{IV} \times I_{III}$	$\frac{26}{30} = 0,86$
Diploïdes ($2n$)	$11b \times 9b$	$\frac{29}{30} = 0,96$

Ces résultats, destinés à mettre au point la technique, permettent de retenir d'une part le niveau deuxième ovule pour l'excision et d'autre part les temps cinq heures et six heures d'incubation pour la lecture des résultats. (Le deuxième temps de mesure a été retenu pour vérifier si une évolution en fonction du temps existe ou non). Les relations style-pollen seront donc étudiées sur des styles excisés comportant une partie de l'ovaire avec deux ovules (fig. 3 et 4).

Dans la mesure où il est impossible de déterminer avec précision le nombre de tubes polliniques qui émergent à la base d'un style excisé, l'indice de mesure retenu est la fréquence de styles présentant à leur base des tubes polliniques. Cette fréquence, est calculée sur un échantillon de cinquante styles excisés par autofécondation ou croisement.

TABLEAU 3

Relations style-pollen en autopollinisation. Fréquence de styles excisés au niveau du deuxième ovule présentant à leurs bases des tubes polliniques. (Coupes longues.)

Génotypes	1re Répétition	2e Répétition	Structures génétiques
HS_{IV}	$\frac{19}{50} = 0,38$	$\frac{16}{45} = 0,35$	Hybrides simples $4n$
HS_{V}	$\frac{19}{40} = 0,47$	$\frac{22}{50} = 0,44$	
III_1	$\frac{20}{30} = 0,66$	$\frac{29}{52} = 0,58$	
V_1	$\frac{19}{30} = 0,63$	$\frac{37}{52} = 0,71$	
V_2	$\frac{11}{30} = 0,36$	$\frac{15}{52} = 0,28$	
VI_3	$\frac{6}{30} = 0,20$	$\frac{12}{50} = 0,24$	
X_1	$\frac{19}{30} = 0,63$	$\frac{36}{50} = 0,72$	
X_2	$\frac{19}{30} = 0,63$	$\frac{36}{51} = 0,70$	
X_3	$\frac{17}{30} = 0,56$	$\frac{30}{52} = 0,57$	
HD_I	$\frac{8}{30} = 0,26$	$\frac{13}{45} = 0,28$	Hybrides doubles $4n$
HD_{IV}	$\frac{14}{45} = 0,31$	$\frac{17}{50} = 0,34$	
I_{III}	$\frac{1}{50} = 0,02$	$\frac{5}{50} = 0,10$	Inbred $4n$
I_{VI}	$\frac{9}{45} = 0,20$	$\frac{8}{50} = 0,16$	
$9b$	$\frac{9}{50} = 0,18$	$\frac{11}{50} = 0,22$	Diploïdes ($2n$)
$11b$	$\frac{18}{50} = 0,36$	$\frac{16}{50} = 0,32$	

TABLEAU 4

Relations style-pollen en allopollinisation. Fréquences de styles excisés au niveau du deuxième ovule présentant à leurs bases des tubes polliniques. (Coupes longues).

Croisements ♀ + ♂	1er Répétition	2e Répétition
$II_3 \times V_3$	$\frac{41}{50} = 0,82$	$\frac{47}{50} = 0,94$
$II_3 \times VI_3$	$\frac{35}{50} = 0,70$	$\frac{31}{50} = 0,62$
$II_3 \times VII_3$	$\frac{43}{65} = 0,66$	$\frac{38}{50} = 0,76$
$II_3 \times X_3$	$\frac{22}{53} = 0,41$	$\frac{18}{50} = 0,36$
$III_3 \times X_3$	$\frac{29}{50} = 0,58$	$\frac{28}{51} = 0,54$
$V_3 \times X_3$	$\frac{29}{50} = 0,58$	$\frac{28}{50} = 0,56$
$VI_3 \times X_3$	$\frac{39}{50} = 0,78$	$\frac{46}{50} = 0,92$
$VIII_3 \times X_3$	$\frac{35}{50} = 0,70$	$\frac{38}{50} = 0,76$
$IX_3 \times X_3$	$\frac{38}{50} = 0,76$	$\frac{47}{53} = 0,88$

Chaque style traversé par des tubes polliniques est considéré comme une gousse potentielle. La fréquence de sorties de tubes polliniques sur styles excisés est à rapprocher de la fréquence de formation de gousse par fleur déclenchée utilisée pour noter la fertilité à la maturation des gousses.

II. — *Autofertilité* in vivo *et relations style-autopollen en semi* in situ

Les relations style-autopollen, caractérisées par la germination du pollen sur le stigmate et l'élongation des tubes polliniques à travers les tissus conducteurs du style peuvent être qualifiées « d'autopermissivité » des tissus femelles à la pénétration des tubes polliniques.

L'autopermissivité, mesurée par la fréquence des styles excisés présentant des sorties de tubes polliniques après 5 et 6 heures d'incubation, dépend de l'aptitude des tissus femelles (style) à se laisser traverser par l'autopollen, du pouvoir germinatif et de l'aptitude à la croissance du pollen dans un environnement génotypique identique à celui dont il est issu.

L'analyse de la variabilité de l'autofertilité *in vivo* et de l'autopermissivité semi *in situ* a pour but non seulement de différencier les familles, mais aussi de mettre en rapport ces deux caractères pour apprécier l'influence des premiers stades de la reproduction (relations style-autopollen) sur la productivité d'une autofécondation à la maturité.

Dix familles d'hybrides simples de Luzerne cultivée d'origines diverses ont été analysées. Chaque famille est représentée par trois plantes sœurs.

Les résultats des autofécondations *in vivo* et des autopollinisations en semi *in situ* sont traités selon un modèle à deux facteurs hiérarchisés et à effets fixes.

Soit $yijk$ l'indice de mesure du caractère sur l'individu j appartenant à la famille i dans la répétition k, le modèle s'écrit :

$$yijk = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + Eijk$$

μ est la moyenne générale;

α_i est un effet moyen de la famille i $\sum\alpha_i = 0$;

β_{ij} est un effet de l'individu j dans la famille i;

$Eijk$ est une variable aléatoire résiduelle d'espérance nulle et de variance σ_e^2.

Résultats expérimentaux

I. — *Analyses de l'autopermissivité des familles observée après* 5 *et* 6 *heures d'incubation.*

Les analyses de variance révèlent une importante variabilité de l'autopermissivité entre les familles observées, aussi bien après 5 que 6 heures de mise en culture (tabl. 5 et 6).

Afin d'étudier l'évolution de l'autopermissivité dans le temps, une analyse de la variance à un facteur a été effectuée sur les différences d'autopermissivité des familles entre 5 et 6 heures d'incubation (tabl. 7).

L'absence de signification entre les différences d'autopermissivité en fonction du temps montre que l'évolution de ce caractère est constante, quelque soit la famille entre 5 et 6 heures d'incubation et les mesures après 5 heures de culture suffisent pour estimer l'autopermissivité d'une famille.

TABLEAU 5

Analyse de l'autopermissivité des familles après 5 heures d'incubation
Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des Carrés	ddl	Carré Moyen	F
Totale	15 689,5	59		
Famille	9 933,8	9	1 103,7	24,6 (**)
Effet de l'individu dans la famille	4 411,1	20	220,5	4,9 (**)
Résiduelle	1 344,5	30	44,8	

TABLEAU 6

Analyse de l'autopermissivité des familles après 6 heures d'incubation
Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Totale	15 322,2	59		
Famille	9 559,1	9	1 062,1	19,3 (**)
Effet de l'individu dans la famille	4 116,4	20	205,8	3,7 (**)
Résiduelle	1 646,7	30	54,8	

TABLEAU 7

Analyse sur les différences d'autopermissivité observées entre 5 et 6 heures d'incubation
Résultats de l'analyse de la voriance

Source de variation	Somme des Carrés	ddl	Carré moyen	F
Totale	107,5	29		
Entre les familles	52,4	9	5,8	2,1 NS
Résiduelle	55,0	20	2,7	

(**) Significatif à 1 p. 100.
NS Non significatif.

II. — *Analyse de l'autofertilité* in vivo

L'analyse de la variance révèle que la variabilité de l'autofertilité entre les familles est prépondérante bien que la variabilité entre les représentants d'une même famille reste importante (tabl. 8).

TABLEAU 8

Autofertilité des familles estimée par la fréquence de formation des gousses (Résultats de l'analyse de la variance)

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré Moyen	F
Totale	21 902,2	59		
Effet Famille	14 069,0	9	1 563,2	70,44 (**)
Effet individu dans la famille. . . .	7 167,4	20	358,3	16,28 (**)
Résiduelle	665,7	30	22,1	

N.B. : (**) Hautement significatif.

Un test de DUNCAN, avec un risque de première espèce de 0,05, permet de comparer les familles entre elles et de les classer dans l'ordre : pour leur autofertilité moyenne,

0,693	0,577	0,576	0,559	0,425	0,309	0,286	0,242	0,079	0,041
X	VII	V	I	VI	II	VIII	III	IV	IX

pour leur autopermissivité après 5 heures d'incubation,

0,663	0,538	0,483	0,396	0,360	0,326	0,266	0,222	0,145	0,040
X	III	VII	V	I	VIII	II	VI	IX	IV

pour leur autopermissivité moyenne après 6 heures d'incubation,

0,668	0,572	0,503	0,436	0,413	0,373	0,320	0,288	0,145	0,060
X	III	VII	V	I	VIII	II	VI	IX	IV

III. — *Relations entre l'autofertilité* in vivo *et l'autopermissivité* semi in situ

Une analyse de la variance à trois facteurs a été réalisée pour vérifier si l'autopermissivité et l'autofertilité peuvent être considérées comme deux types de mesure du même caractère : la productivité d'une autofécondation.

Le modèle d'analyse est à effets fixes à trois facteurs dont deux sont hiérarchisés (l'effet individu est subordonné à l'effet famille).

$$yijk = \mu + \alpha_i + \delta_k + \gamma_{ik} + \beta ij + Eijk$$

où $yijk$ représente la mesure du caractère sur l'individu j appartenant à la famille i selon le type de mesure k,

α_i est l'effet de la famille,
δ_k est l'effet type de mesure,
γ_{ik} représente une interaction entre l'effet famille et l'effet type de mesure,
β_{ij} est l'effet de l'individu j dans la famille i,
E_{ijk} est une variable aléatoire résiduelle d'espérance nulle et de variance σ_e^2.

TABLEAU 9

Comparaison des deux types de mesures de la productivité en autofécondation : Autofertilité in vivo. *Autopermissivité estimée après 5 h d'incubation. Résultats de l'analyse de la variance*

Origine de la variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Totale	16 980,3	59	287,8	
Famille	10 321,8	9	1 146,8	15,05 ((**)
Type de Mesure	42,9	1	42,9	0,57 NS
Effet de l'individu dans la Famille	3 806,1	20	190,3	2,49 (*)
Interaction Famille-type de mesure	1 284,9	9	142,7	1,87 NS
Résiduelle	1 524,4	20	76,2	

TABLEAU 10

Comparaison des deux types de mesures de la productivité en autofécondation. Autofertilité in vivo, *autopermissivité estimée après 6 h d'incubation. Résultats de l'analyse de la variance.*

Origine de la variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Totale	16 798,5	59	284,7	
Famille	10 315,1	9	1 146,1	14,9 (**)
Type de mesure	4,3	1	4,4	0,060 NS
Effet de l'individu dans la famille	3 827,1	20	191,3	2,50 (*)
Interaction famille-type de mesure	1 117,9	9	124,2	1,62 NS
Résiduelle	1 534,0	20	76,7	

N.B. (**) Significatif à 1 p. 100.
(*) Significatif à 5 p. 100.
N.S. Non significatif.

Quelque soit la durée d'incubation (5 ou 6 h) les résultats des deux analyses de variance montrent un effet famille hautement significatif tandis que l'effet type de mesure et l'interaction « type de mesure-famille » ne le sont pas (tabl. 9, 10). Toutefois, la variance « type de mesure » est inférieure à la variance résiduelle. Ce résultat laisse supposer que cette résiduelle comprend quelques interactions non prises en considérations.

Il ressort de cette analyse que la productivité de l'autopollinisation en semi *in situ* est équivalente à la mesure de l'autofécondation en *in vivo*. Un style excisé traversé par des tubes polliniques est considéré comme une gousse potentielle, mais sur la plante entière la coulure est un facteur susceptible d'intervenir dans la variabilité de l'autofertilité. GUY *et al.* (1970) constataient que le taux de coulure est une fonction décroissante du nombre de fleurs par inflorescence. Or les familles étudiées ont toujours donné en serre un nombre de fleurs par inflorescence peu élevé (GUY *et al.*, 1971). En plus DELAUDE et TASÉI (1972) observaient qu'en pollinisation artificielle (manuelle) le taux de coulure physiologique est remarquablement constant pendant un mois en période de pleine floraison. Enfin au cours des expériences aucune coulure importante n'a été notée.

Ces différentes remarques montrent que le dessèchement des gousses avant leur maturation n'est pas, dans nos conditions expérimentales, un facteur de variabilité.

TABLEAU II

Analyse des différences de mesure entre l'autofertilité in vivo *et l'autopermissivité estimée après 6 h d'incubation*
Résultats de l'analyse de variance

Origine de la variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Totale	5 303,5	29		
Entre famille	2 235,5	9	248,3	1,62 NS
(Intra familles) Résiduelle	3 067,9	20	153,3	

N.S. = Non significatif.

TABLEAU I2

Relations entre autofertilité in vivo *et autopermissivité semi* in situ
(Estimations des coefficients de corrélation)

Autopermissivité après 5 h et autofertilité *in vivo*		Autopermissivité après 6 h et autofertilité *in vivo*	
Moyennes des familles	Valeurs individuelles	Moyenne des familles	Valeurs individuelles
0,79 (**)	0,68 (**)	0,819 (**)	0,70 (**)

Les coefficients de corrélation calculés sur les moyennes de familles sont estimés avec 8 ddl.
Les coefficients de corrélation calculés sur les valeurs individuelles sont estimés avec 28 ddl.
(**) Significatif à 1 p. 100.

Ainsi la fréquence de formation de gousses en autopollinisation et l'autopermissivité semi *in situ* apparaissent comme deux estimations du même caractère : la productivité d'une autofécondation.

Ce résultat est confirmé par une autre analyse de la variance réalisée sur les différences de mesures individuelles entre l'autofertilité et l'autopermissivité estimée après 6 heures d'incubation; l'effet famille n'est pas significatif (tabl. 11).

Enfin les corrélations entre l'autofertilité mesurée *in vivo* et l'autopermissivité estimée après 5 ou 6 heures d'incubation calculées sur les moyennes de familles ainsi que sur les valeurs individuelles sont toutes hautement significatives (tabl. 12).

Conclusion

Au cours de la mise au point de la technique *semi in situ*, il a été constaté la nécessité de laisser un ou deux ovules avant la section du style pour obtenir des sorties de tubes polliniques à la base des styles excisés. L'hypothèse d'un rôle actif des ovules sur la croissance pollinique à travers les tissus femelles est avancée tenant compte du fait qu'aucune sortie de tubes polliniques n'est observée lorsque l'excision est pratiquée à la base du style avant le premier ovule.

La forte corrélation entre autopermissivité et autofertilité révèle une liaison étroite entre la productivité d'une autofécondation et la fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques 5 ou 6 heures après la pollinisation. Le produit final d'une autofécondation serait largement conditionné par les évènements qui se produisent dès les premières heures après la pollinisation et l'effet de l'apparentement entre le style et le pollen se manifesterait donc dès les premières étapes de la fécondation.

La technique semi *in situ* permet bien d'aborder les relations style-pollen, on verra plus tard ce qu'elle apporte comme renseignements pour les croisements.

Enfin, l'autopermissivité peut être considérée comme une bonne estimation de l'autofertilité, d'un point de vue pratique la technique des styles excisés est un moyen rapide pour obtenir une estimation de l'autofertilité d'une famille ou d'un individu.

Reçu pour publication en décembre 1979.

Summary

A method for the study of the relationships between style and pollen grain in semi in situ *in Alfalfa* (Medicago sativa *L.*)

Several mechanisms related to floral biology of Alfalfa promote allogamy without preventing autogamy. Just after self- or cross-pollination, the relations « style-pollen » are revealed by pollen grain germination and pollen tube growth through the female tissues. These features appear to be one of the important conditions for fertility.

A method is set up to study the relations « style — pollen » in semi *in situ* in Alfalfa. Just after pollination, the flower is dissected and the pistil is withdrawn. Then the stigma, the style and the upper part of the ovary (which include two ovules) are excised. By convenience, the word style shall be used alone here but it means the whole part excised.

After an incubation period, the styles which show emerging pollen tubes are counted and their frequency is calculated from samples of 50 styles each. This frequency quantifies the relations « style-pollen grain » in semi *in situ*.

When the styles excised do not include ovules, no emerging pollen tube is seen; on the contrary, pollen tubes are seen emerging when two ovules are included. The observations suggest the hypothesis that ovules may have a part in the pollen tube growth.

The study of the relations « style-pollen grains » has shown a great variability as the analysis of self fertility *in vivo* between the ten single cross families studied. Statistical analysis show that the two kinds of productivity measurement of a self pollination are not meaningly different.

The autopermissivity which defines style-self pollen in semi *in situ* relations and the self fertilization *in vivo* may be considered as two estimations of the same feature.

The excised style method provides a fast and practical mean for self fertility value measurement.

Références bibliographiques

ABDELKEFI A., 1978. *Valeur pollinique et fertilité femelle à différentes étapes de la reproduction chez la Luzerne* (Medicago sativa *L.*). Thèse 3e cycle, Université Paris sud, Orsay, 119 p.)

ASCHER P. D., PELOQUIN S. J., 1966. Effect of floral aging on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in *Lilium longiflorum*. *Amer. J. Bot.*, **53**, 99-102.

BREWBAKER J. L., MAJUMBER S. K., 1961. Cultural studies of the pollen population effect and the self incompatibility inhibition. *Amer. J. Bot.*, **48**, 457-464.

DELAUDE A., TASEI J. N., 1972. Premières observations sur la pollinisation et la coulure des fleurs de luzerne en Charentes (*Medicago sativa* L.) *Apidologie*, **3** (1), 79-97.

DEMARLY Y., 1963. Génétique des tétraploïdes et amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes*, **13**, 307-408.

EMERSON S., 1940. Growth of incompatible pollen tubes in *Œnothera organensis*. *Bot. Gaz.*, **101**, 890-911.

GUY P., ECALLE C., GENIER G., 1970. Influence de la morphologie d'une inflorescence sur la production de graines. Symp. Production de graines de luzerne. Polawy-Pologne, VIII, 1970.

GUY P., BLONDON F., DURAND, 1971. Action de la température et de la durée d'éclairement sur la croissance et la floraison de deux types éloignés de luzerne cultivée, *Medicago sativa L. Ann. Amélior. Plantes*, **21** (4), 409-422.

HECHT A., 1960. Growth of pollen tubes of *Œnothera organensis* through otherwise incompatible styles. *Amer. J. Bot.*, **47**, 32-36.

KENDALL W. A., 1968. Growth of *Trifolium pratense* L. pollen tubes in compatible and incompatible styles of excised pistils. *Theor. appl. Genet.*, **38**, 351-354.

KWACK B. H., 1965. Stylar culture of pollen and physiological studies of self incompatibility in *Œnothera organensis*. *Physiol. Plant.*, **18**, 297-305.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 285-307.

Analyse des paramètres de la fertilité en croisement *in vivo* et semi *in situ* chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.)

A. ABDELKEFI (*)

Laboratoire de Zoologie,
École normale supérieure
46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05

Résumé

L'étude de la croissance pollinique *in vitro* et l'analyse des relations style-pollen en semi *in situ* associées à l'étude de l'interfertilité sur la plante entière, chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.) ont permis :

— de révéler une liaison étroite entre la croissance pollinique *in vitro* et la valeur pollinique en croisement;

— de mettre en évidence un rôle actif des ovules sur la croissance pollinique à travers le style.

L'attractivité ovulaire s'exerce préférentiellement sur l'allopollen. La croissance de l'autopollen dans le style semble au contraire assez passive.

L'attractivité ovulaire dépend de l'apparentement entre le style et le pollen. Un signal de reconnaissance lié à la nature du style et du pollen s'établirait au cours de l'élongation des tubes polliniques dans le style.

Introduction

Chez la Luzerne cultivée, l'autofertilité et l'interfertilité sont deux manifestations, liées l'une à l'autre, de la fertilité de la plante; malgré cette liaison, le régime de reproduction de la Luzerne, essentiellement allogame, résulte de divers mécanismes liés à la biologie florale de la plante. Dans les conditions naturelles et en croisements contrôlés sans castration, après le déclenchement de la fleur, l'autopollen et l'allopollen se trouvent en compétition sur le stigmate : l'allopollen est avantagé et assure les fécondations (DEMARLY, 1963; GARTNER *et al.*, 1966).

(*) Adresse actuelle : Laboratoire de génétique et biométrie, Faculté des sciences de Tunis, Campus universitaire, Le Belvédère, Tunis.

La méthode d'étude des relations style-pollen en semi *in situ* (ABDELKEFI, 1978), plus dynamique et moins lourde que les techniques histologiques d'étude de la croissance pollinique à travers les tissus femelles, associée à l'étude de la croissance pollinique *in vitro* et à l'analyse de l'interfertilité *in vivo* permet de préciser certains phénomènes qui confèrent un avantage sélectif à l'allopollen et assurent le maintien de l'hétérozygotie de la Luzerne.

Matériel et technique

Dix familles « d'hybrides simples » de Luzerne cultivée tétraploïde (*Medicago sativa* L.) d'origines différentes ont été retenues. Ce matériel a été préparé à la Station d'Amélioration des Plantes fourragères de Lusignan. Une famille est issue du croisement de deux « lignées » (au sens large) et tous les individus qui la composent sont des pleins frères.

« Les hybrides simples montrent toujours une uniformité phénotypique très nettement supérieure à celle des lignées les plus homogènes » (DEMARLY, 1963). Les individus d'une même famille présentent en effet certaines caractéristiques phénotypiques communes telles le port de la plante, la dimension de l'inflorescence, la couleur de la fleur, etc... mais ils ne sont pas tous génétiquement identiques

Chaque famille est représentée par trois plantes sœurs. Un groupe composé d'un représentant de chaque famille forme une répétition.

Les croisements *in vivo* ainsi que l'étude semi *in situ* font intervenir tous les génotypes d'une répétition comme source de pollen et comme parent femelle.

Le modèle mathématique utilisé pour l'analyse des résultats, inspiré du schéma d'analyse diallèle, est celui employé dans les études de compétition (CHALBI, 1969; GALLAIS, 1970).

$$Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + \gamma ij + b_k + Eijk$$

$Yijk$ représente l'indice de mesure de la production de la femelle i pollinisée par le mâle j dans la répétition k

μ est la moyenne générale.

αi est un effet moyen centré du parent femelle i testé par rapport aux p-1 plantes mâles.

βj est un effet moyen centré du parent j utilisé en tant que mâle face aux p-1 plantes femelles.

γij représente une interaction entre les parents i et j

b_k est un effet moyen centré de la k^e répétition.

$Eijk$ est une variable aléatoire résiduelle d'espérance nulle et de variance σ_e^2.

L'analyse porte sur les sommes et les différences et bien que la terminologie utilisée dans l'étude de l'interfertilité *in vivo* soit celle des croisements diallèles, la signification biologique des divers paramètres en est totalement différente puisque les mesures ne portent pas sur la descendance F_1 (DATTÉE, 1975).

Méthode d'étude des relations style-pollen en semi in situ

La technique des styles excisés a été présentée dans un article précédent (ABDELKEFI, 1980).

Culture du pollen in vitro

La culture du pollen *in vitro* est une méthode simple et rapide pour apprécier le pouvoir germinatif du pollen et la croissance pollinique (BARNES et CLEVELAND, 1963, 1972).

Le milieu de culture se compose de 100 ppm d'acide borique, 1 p. 100 d'agar et 10 p. 100 de saccharose par litre d'eau.

Pour obtenir une bonne dispersion des grains de pollen et une densité relativement constante d'une préparation à l'autre, les fleurs sont déclenchées au-dessus d'un tamis (formé d'une toile à blutter de maille 40 μ), un pinceau promené à la surface de la « passoire » permet le passage des grains de pollen à travers les mailles de la toile à blutter et leur répartition sur le milieu (CORNUET, 1974).

Après l'ensemencement la préparation est installée dans une étuve obscure à $26^0 \pm 1\ ^0C$.

La manipulation des tubes polliniques n'est pas aisée et la mesure de leur longueur nécessite l'emploi d'une méthode qui arrête rapidement leur croissance (blocage par un refroidissement rapide ou par l'addition de poison chimique). Pour éviter ces inconvénients, il a été décidé de fixer les grains de pollen d'une plage sur des clichés photographiques (CORNUET, 1974). Cette technique permet non seulement de suivre la croissance individuelle des grains de pollen en fonction du temps, mais aussi d'apprécier le comportement du pollen issu de deux génotypes différents mis en association sur le même milieu de culture (DEBRAND *et al.*, 1979).

Afin de suivre la croissance individuelle des grains de pollen en fonction du temps, le repérage de la plage à photographier est indispensable. Un triangle en papier d'aluminium est déposé au centre du champ photographique, (fig. 1 et 2). Les clichés photographiques sont pris une heure et deux heures après le dépôt du pollen.

Le négatif correspondant au cliché une heure est projeté sur un écran couvert d'une feuille de papier blanc sur laquelle est reproduit le contour du triangle. Les grains germés sont numérotés et leur longueur mesurée à l'aide d'un curvimètre en suivant la projection des tubes polliniques. Le cliché deux heures est ensuite projeté sur la même feuille de sorte que chaque grains de pollen retrouve sa place fixée sur le papier en recouvrant exactement la trace relevée au cours de la projection du cliché une heure.

Il est ainsi possible de mesurer avec le curvimètre la longueur des mêmes tubes polliniques à deux heures.

Toutes les préparations sont placées à la même distance du photo-objectif (distance focale) et la distance séparant l'écran de l'appareil de projection est maintenue constante durant toutes les mesures : l'agrandissement est donc constant pour toutes les préparations.

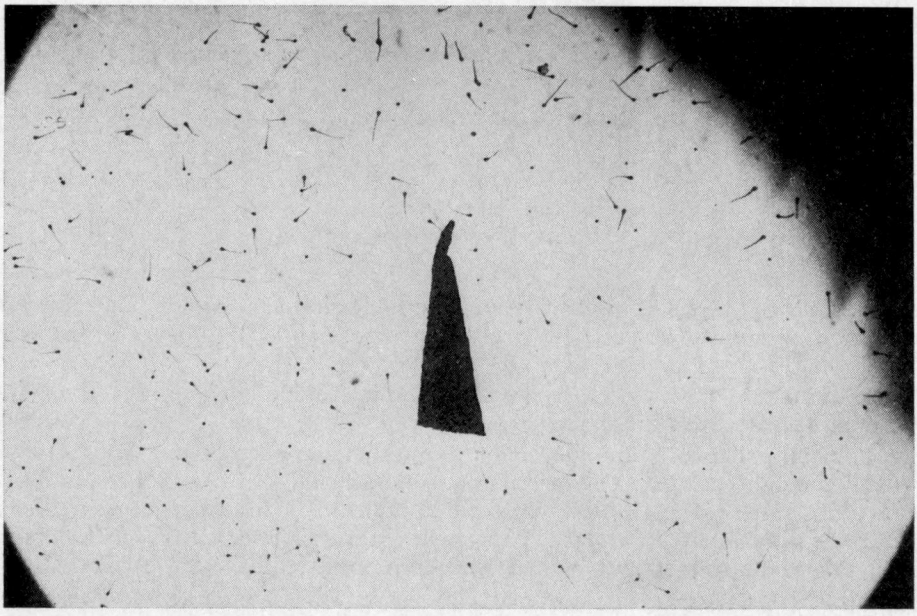


FIG. 1. — *Photographie d'une cellule simple — croissance pollinique 1 h après le dépot du pollen* (× 7).

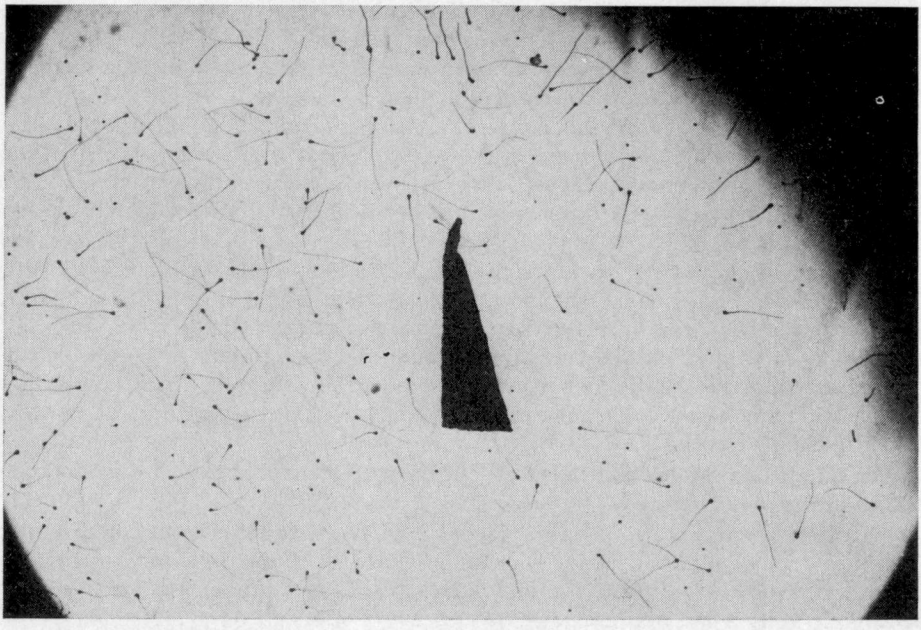


FIG. 2. — *Photographie d'une cellule simple — croissance pollinique 2 h après le dépot du pollen* (× 7).

Résultats expérimentaux

1. — *Analyse de la croissance pollinique* in vitro

Certaines caractéristiques du comportement du pollen *in vitro* dans des conditions de culture contrôlées, pourraient être reliées à la valeur pollinique en croisement *in vivo* (MILLER et SCHONHORST, 1968; RICE *et al.*, 1970; DANE et MELTON,

TABLEAU I

Étude de la croissance pollinique

	Croissance pollinique après 1 h de mise en culture			*Croissance pollinique après 2 h de mise en culture*	
	Longueur moyenne individuelle	Longueur moyenne des familles		Longueur moyenne individuelle	Longueur moyenne des familles
I 1	10,03	11,23	I 1	13,60	28,11
I 2	11,76		I 2	36,96	
I 3	11,90		I 3	33,76	
II 1	9,56	11,30	II 1	32,60	32,70
II 2	13,46		II 2	40,63	
II 3	10,86		II 3	24,86	
III 1	10,90	13,63	III 1	30,53	36,00
III 2	16,53		III 2	47,40	
III 3	13,46		III 3	30,06	
IV 1	—	7,13	IV 1	—	24,02
IV 2	7,16		IV 2	25,46	
IV 3	7,10		IV 3	22,56	
V 1	12,46	13,56	V 1	34,00	41,58
V 2	14,10		V 2	45,43	
V 3	14,13		V 3	45,33	
VI 1	11,86	13,07	VI 1	38,60	37,35
VI 2	15,50		VI 2	47,76	
VI 3	11,86		VI 3	25,70	
VII 1	11,76	12,92	VII 1	37,13	40,35
VII 2	14,06		VII 2	45,06	
VII 3	12,93		VII 3	38,86	
VIII 1	17,86	14,86	VIII 1	51,10	42,60
VIII 2	11,86		VIII 2	34,10	
VIII 3	—		VIII 3	—	
IX 1	10,10	7,87	IX 1	30,80	24,34
IX 2	7,90		IX 2	23,80	
IX 3	5,63		IX 3	18,43	
X 1	13,70	15,13	X 1	44,23	46,81
X 2	17,70		X 2	50,70	
X 3	14,00		X 3	45,50	

— : Génotype non étudié.
N.B. : Agrandissement = 42 mm représentent 1 mm sur le milieu de culture.

1973) ou en semi *in situ* et fournir ainsi, une mesure plus simple de la valeur moyenne des familles pour leur effet mâle.

La longueur moyenne des tubes polliniques atteinte après une heure et deux heures de mise en culture est estimée à partir d'un échantillon de 30 grains germés pris au hasard pour chaque génotype. La croissance pollinique d'une famille, pour ces deux temps de mesure est estimée par la moyenne des trois résultats individuels (tabl. 1).

L'analyse de la longueur moyenne des tubes polliniques est réalisée selon un modèle à deux facteurs hiérarchisés et à effets fixes.

$$Yijk = \mu + \alpha i + \beta_{ij} + E_{ijk}$$

$Yijk$ est la mesure de la longueur du k^e grain $1 < k \leqslant 30$ du j^e individu $1 < j \leqslant 3$ de la i^e famille $1 < i \leqslant 10$.

μ = est la moyenne générale.

α_i = est l'effet moyen de la famille.

β_{ij} = est l'effet de l'individu dans la famille.

E_{ijk} = représente une variable aléatoire résiduelle d'espérance nulle et de variance σ_e^2.

L'analyse des résultats de la croissance pollinique après une heure de mise en culture révèle un effet famille ainsi qu'un effet individu dans la famille hautement significatifs (tabl. 2) et il en est de même pour l'analyse des résultats obtenus après deux heures d'incubation (tabl. 3).

Les corrélations entre les longueurs des tubes polliniques mesurées une heure et deux heures après l'ensemencement calculées sur les moyennes de familles ($r = 0{,}94$; et 8 ddl) ainsi que sur les valeurs individuelles ($r = 0{,}87$ et 26 ddl) sont hautement significatives.

En traduisant l'importance de la liaison entre les croissances polliniques mesurées une heure et deux heures après l'ensemencement, ces corrélations indiquent

TABLEAU 2

Étude de la croissance pollinique en cellule simple après 1 h de mise en culture
Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés des écarts	ddl	Carré moyen	F
Totale	19 059,79	839	22,7	
Effet famille . . .	5 046,96	9	560,7	38,92 (**)
Effet individu dans la famille	2 313,93	18	128,5	8,92 (**)
Résiduelle.	11 698,90	812	14,4	

(**) Significatif à 1 p.1 00.

TABLEAU 3

Étude de la croissance pollinique en cellule simple après 2 h de mise en culture
Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés des écarts	ddl	Carré moyen	F
Totale	140 698,85	839	167,6	
Effet famille . . .	45 060,53	9	5 006,7	70,15 (**)
Effet individu dans la famille	37 692,55	18	2 094,0	29,34 (**)
Résiduelle.	57 945,76	812	71,3	

(**) Significatif à 1 p. 100.

que la mesure faite à une heure représente une bonne variable prédictrice de la croissance pollinique mesurée après deux heures d'incubation et qu'elle peut fournir autant d'informations que cette dernière.

Par ailleurs, la mise en évidence d'un effet famille hautement significatif dans chacune de ces analyses de la variance et la bonne concordance des classements des individus d'une répétition à l'autre, malgré la variabilité intra-famille, viennent appuyer l'hypothèse d'un déterminisme génétique contrôlant la croissance pollinique.

2. — *Relations style-pollen en allopollinisation*

La formation d'une gousse est le résultat d'une suite d'évènements dont la germination du pollen sur le stigmate et son élongation à travers le style. L'étude des relations style-pollen par la méthode semi *in situ* permet de définir une « permissivité » des tissus femelles à la pénétration des tubes polliniques.

La permissivité dépend du génome du sporophyte et particulièrement de sa partie femelle ainsi que de la valeur pollinique du gamétophyte mâle.

Soit le paramètre $g_i = \frac{\alpha_i + \beta_i}{2}$ où

α_i est l'effet moyen centré de la partie femelle du sporophyte i pollinisé par les $p - 1$ gamétophytes mâles.

β_i est l'effet moyen centré du gamétophyte mâle i lorsqu'il pollinise les $p - 1$ femelles.

Le paramètre g_i représente, alors, la permissivité moyenne de la famille i lorsqu'elle est utilisée en allopollinisation aussi bien comme gamétophyte mâle ou comme support femelle. La fréquence des styles excisés traversés par des tubes polliniques après cinq et six heures d'incubation est estimée pour chaque croisement et dans chaque répétition sur un échantillon de cinquante fleurs allopollinisées (tabl. 4 et 5). Les fréquences sont transformées en Arc sin $\sqrt{\ }$ afin de normaliser la distribution.

L'analyse statistique des résultats (moyennes des familles après 5 et 6 h

TABLEAU 4

Étude des relations style-pollen. Performances des familles
Fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques
(Moyennes des 3 résultats individuels), *après 5 h d'incubation*

♀ \ ♂	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I		0,566	0,606	0,493	0,560	0,506	0,800	0,666	0,506	0,693
II. . . .	0,246		0,260	0,546	0,533	0,440	0,760	0,420	0,340*	0,420
III . . .	0,700	0,706		0,640	0,700	0,493	0,703	0,600	0,673	0,533
IV . . .	0,346	0,340	0,456		0,670	0,366	0,502	0,510	0,250	0,443
V . . .	0,506	0,506	0,506	0,560		0,486	0,640	0,600	0,713	0,640
VI . . .	0,313	0,313	0,526	0,326	0,510		0,610	0,380	0,253	0,596
VII . . .	0,500	0,633	0,656	0,486	0,483	0,636		0,440	0,486	0,636
VIII . .	0,493	0,323	0,560	0,413	0,533	0,346	0,626		0,400	0,523
IX . . .	0,526	0,673	0,660	0,500	0,716	0,663	0,733	0,673		0,863
X . . .	0,740	0,680	0,643	0,653	0,680	0,563	0,786	0,613	0,606	

N.B.: Les fréquences sont transformées en arc sin $\sqrt{\ }$.
(*) Un des 3 résultats individuels a été estimé.

TABLEAU 5

Étude des relations style-pollen. Performances des familles
Fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques
(Moyennes des 3 résultats individuels) *après 6 h d'incubation*

♀ \ ♂	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I		0,720	0,666	0,620	0,686	0,600	0,846	0,726	0,560	0,743
II. . . .	0,366		0,393	0,633	0,706	0,613	0,880	0,546	0,410*	0,513
III . . .	0,726	0,786		0,726	0,700	0,553	0,763	0,666	0,726	0,580
IV . . .	0,473	0,513	0,523		0,736	0,406	0,570	0,620	0,370	0,490
V . . .	0,566	0,560	0,540	0,620		0,520	0,713	0,660	0,746	0,660
VI . . .	0,426	0,386	0,553	0,360	0,596		0,720	0,453	0,286	0,630
VII . . .	0,533	0,726	0,670	0,580	0,596	0,703		0,560	0,613	0,636
VIII . .	0,533	0,530	0,600	0,500	0,600	0,373	0,686		0,526	0,610
IX . . .	0,640	0,786	0,703	0,566	0,730	0,810	0,753	0,726		0,890
X . . .	0,806	0,740	0,643	0,693	0,680	0,583	0,806	0,673	0,633	

N.B.: Les fréquences sont transformées en arc sin $\sqrt{\ }$.
(*) Un des 3 résultats individuels a été estimé.

TABLEAU 6

Étude des relations style-pollen au niveau des familles. Résultats de l'analyse de la variance de la fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques après 5 h d'incubation

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	23 518,58	134		
Répétition	386,15	2	193,07	1,42 NS
Permissivité	7 840,52	9	871,16	6,41 (**)
Effet spécifique du couple. . .	3 474,00	35	99,25	0,73 NS
Résiduelle	11 817,91	88	135,83	
Liée aux différences	19 209,57	135		
Effet différentiel	5 266,56	9	585,17	4,76 (**)
Effet différentiel particulier .	2 996,26	36	83,22	0,68 NS
Résiduelle	10 946,75	90	122,99	
Total	42 728,15	269		

TABLEAU 7

Étude des relations style-pollen au niveau des familles. Résultats de l'analyse de la variance de la fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques après 6 h d'incubation

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	19 755,76	134		
Répétition	665,39	2	332,69	2,62 NS
Permissivité	5 349,85	9	594,42	4,69 (**)
Effet spécifique du couple. .	2 710,56	35	77,44	0,61 NS
Résiduelle	11 029,96	88	126,78	
Liée aux différences	17 168,15	135		
Effet différentiel	4 805,34	9	533,92	5,32 (**)
Effet différentiel particulier. .	3 422,95	36	95,08	0,95 NS
Résiduelle	8 939,86	90	100,44	
Total	36 923,91	269		

(**) Significatif à 1 p. 100.
N.S. : Non significatif.

d'incubation) fait apparaître un effet permissivité ainsi qu'un effet différentiel de la partie femelle du sporophyte hautement significatifs, tandis que l'effet spécifique, l'effet différentiel particulier et l'effet répétition ne sont pas significatifs (tabl. 6, 7 et 8).

Afin d'apprécier l'évolution des relations style-pollen en fonction du temps, une analyse de la variance a été réalisée sur les différences de fréquences de styles traversés par des tubes polliniques observées entre cinq et six heures de mise

TABLEAU 8

Étude des relations style-pollen

a) *Classement des familles en groupes en fonction de l'estimation de l'effet de la partie femelle du sporophyte* (α_i).

Temps de mesure \ Classement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 h de mise en culture . .	+ 7,9	+ 7,2	+ 5,7	+ 2,9	+ 1,6	+ 1,2	— 4,8	— 6,6	— 7,3	— 7,8
	X	IX	III	I	V	VII	VIII	II	IV	VI
6 h de mise en culture . . .	+ 6,4	+ 5,4	+ 4,6	+ 4,0	+ 1,1	+ 0,5	— 2,8	— 4,2	— 5,8	— 9,1
	IX	X	III	I	VII	V	II	VIII	IV	VI

b) *Classement des familles en groupes en fonction de l'estimation de l'effet du gamétophyte mâle* (β_i)

Temps de mesure \ Classement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 h de mise en culture . .	+ 8,9	+ 4,0	+ 3,6	+ 0,34	— 0,52	— 1,9	— 2,9	— 3,7	— 3,8	— 3,9
	VII	X	V	III	VIII	II	IV	VI	IX	I
6 h de mise en culture . .	+ 7,9	+ 3,6	+ 2,1	+ 1,2	+ 0,13	— 1,4	— 2,4	— 2,8	— 3,9	— 4,5
	VII	V	X	II	VIII	III	IV	I	IX	VI

N.B. : Les familles dont les numéros sont réunis par un même trait ne diffèrent pas de façon significative.

en culture pour les moyennes des familles. Les résultats révèlent un effet permissivité hautement significatif tandis que l'effet différentiel ne l'est pas (tabl. 9).

Bien que le coefficient de corrélation de rang de SPEARMAN entre les deux estimations de la permissivité (g_i) obtenues pour les deux temps de mesure (r_s = 0,96 et 8 ddl) diffère de zéro de façon significative au seuil de 0,01, l'analyse de la variance sur les différences de fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques entre cinq et six heures de mise en culture révèle que l'évolution de la permissivité diffère selon les familles tandis que l'effet différentiel semble constant (tabl. 9).

Deux situations limites peuvent être décrites : dans la première l'expression

TABLEAU 9

Analyse sur les différences de fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques observées entre 5 et 6 heures d'incubation pour les moyennes de familles. Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	4 336,51	44		
Permissivité	3 083,05	9	342,56	9,56 (**)
Résiduelle	1 253,46	35	35,81	
Liée aux différences	1 674,46	45		
Effet différentiel	188,23	9	20,91	0,51 NS
Résiduelle	1 486,70	36	41,29	
Total	6 011,44	89		

(**) Significatif à 1 p. 100.
N.S. : Non significatif.

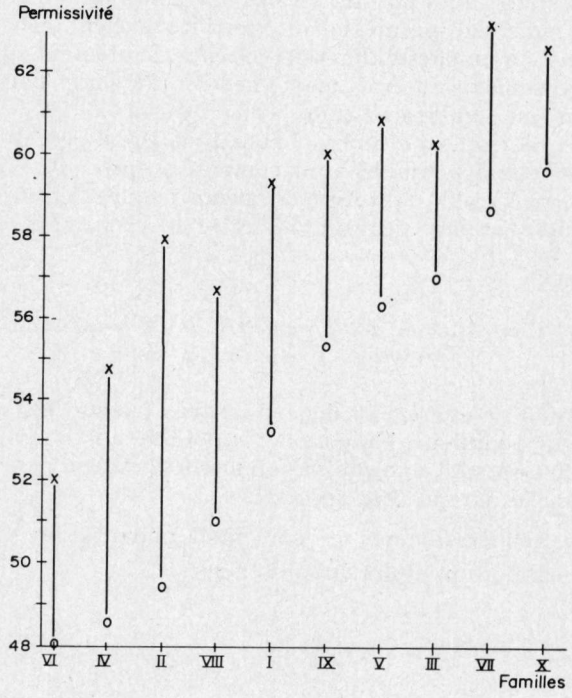


FIG. 3. — *Étude de l'évolution de la permissivité des familles en fonction du temps.*

O Valeurs (non centrées) des estimations de la permissivité après 5 h d'incubation.
X Valeurs (non centrées) des estimations de la permissivité après 6 h d'incubation.
Les familles sont classées en fonction de la permissivité estimée après 5 h d'incubation.

de la permissivité après cinq heures d'incubation est faible (I) ou mauvaise (II, IV, VIII) et son évolution apparaît importante. En revanche, lorsque la permissivité estimée après cinq heures de mise en culture est élevée, son amélioration apparaît relativement faible (fig. 3). Ces observations expliquent la bonne corrélation de rang, mais aussi l'existence d'une évolution de la permissivité. Le contact entre le gamétophyte mâle et la partie femelle du sporophyte pendant les cinq premières heures exprimerait alors les grandes tendances, du classement des familles, qui dominent les relations style-pollen tandis-que l'évolution de la permissivité dans le temps rendrait compte d'une plus ou moins grande « facilitation » à la pénétration des tubes polliniques dans les tissus femelles.

L'étude quantitative des relations style-pollen sur les familles par la méthode semi *in situ* ne révèle aucune interaction; la non signification statistique de ces effets semble indiquer que les interactions entre la partie femelle du sporophyte et le gamétophyte mâle pendant les premières phases de la fécondation seraient relativement faibles contrairement aux effets principaux.

3. — *Interfertilité* in vivo

Le résultat d'un croisement peut être estimé par la fréquence de formation des gousses, par le nombre moyen de graines par gousse et par leur produit, le nombre moyen de graines par fleur (tabl. 10 et 11).

Les analyses statistiques portant sur les moyennes de familles, exprimées en fonction des trois indices de mesure de l'interfertilité révèlent une aptitude générale au croisement ainsi qu'un effet différentiel parental hautement significatifs tandis que l'aptitude particulière au croisement, l'effet différentiel particulier et l'effet répétition ne sont pas significatifs (tabl. 12 et 13).

En acceptant un risque d'erreur global de première espèce de 0,10 les estimations de l'effet femelle des familles sont comparées entre elles et classées par la méthode du t corrigé (tabl. 14). Avec le même risque d'erreur les estimations de l'effet mâle des familles peuvent admettre le classement indiqué dans le tableau 15.

4. — *Comparaison des paramètres de la fertilité estimés en semi* in situ *et en* in vivo

La production d'un croisement dépend de deux facteurs essentiels : la fertilité femelle et la valeur pollinique. En posant l'hypothèse qu'un style excisé traversé par des tubes polliniques est une gousse potentielle, les deux paramètres de la fertilité mâle et femelle ont pu être appréciés :

— après les premières heures qui suivent la pollinisation sur styles excisés;

— à la maturité des produits du croisement.

a) *La fertilité femelle*

La corrélation entre les effets femelles des familles estimés à partir de la fréquence de formation des gousses et la fréquence des styles excisés traversés par des tubes polliniques six heures après la pollinisation est pratiquement nulle ($r = -0{,}02$, 8 ddl).

TABLEAU 10

Interfertilité des familles : estimations de la fréquence de formation des gousses. Moyennes des résultats des 3 répétitions

♀ \ ♂	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I		0,86	0,84	0,84	0,83	0,51	0,78	0,86	0,65	0,79
II. . . .	0,86		0,90	0,69	0,86	0,56	0,84	0,85	0,55*	0,94
III . . .	0,81	0,83		0,68	0,83	0,69	0,96	0,89	0,46	0,84
IV . . .	0,85	0,91	0,88		0,91	0,63	0,96	0,91	0,62	0,94
V . . .	0,98	0,92	0,95	0,81		0,86	0,91	0,97	0,79	0,98
VI . . .	0,98	0,86	0,93	0,80	0,99		0,97	0,95	0,74	0,87
VII . . .	0,97	0,98	0,91	0,88	0,99	0,93		0,94	0,75*	0,97
VIII . .	0,95	0,93	0,87	0,73	0,96	0,78	0,85		0,52	0,92
IX . . .	0,92	0,95	0,90	0,84	0,90	0,76	0,96	0,92		0,96
X . . .	0,84	0,89	0,98	0,74	1,0	0,83	0,99	0,96	0,76	

N.B.: (*) Un des trois résultats individuels a été estimé.
Les fréquences sont transformées en Arc sin $\sqrt{\ }$.

TABLEAU 11

Interfertilité des familles :
Estimations du nombre moyen de graines par gousses. Moyennes des résultats des trois répétitions

♀ \ ♂	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I		2,4	2,6	2,4	2,2	1,8	2,6	2,5	2,1	2,4
II. . . .	3,8		3,9	2,6	3,5	2,8	3,8	3,6	1,6*	3,7
III . . .	5,1	5,2		3,7	6,2	5,2	6,6	4,4	2,7	6,3
IV . . .	3,9	4,3	4 6		4,5	3,0	4,1	4,4	2,7	4,5
V . . .	5,9	4,3	5,7	3,8		4,4	5,8	5,4	3,0	5,9
VI . . .	6,2	6,0	6,4	4,9	6,9		6,5	5,4	3,8	6,8
VII . . .	6,0	5,7	6,6	4,8	7,1	5,0		6,2	3,6*	7,7
VIII . .	5,0	4,7	5,8	2,4	7,2	3,8	5,3		2,2	4,8
IX . . .	4,7	4,6	3,7	3,5	3,5	3,6	4,7	4,0		4,4
X . . .	4,7	4,1	4,8	3,1	6,5	5,0	7,1	5,2	2,3	

N.B.: (*) = un des trois résultats individuels a été estimé.

TABLEAU 12

Interfertilité des familles estimée par la fréquence de formation des gousses. Résultats de l'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	18 196,86	134		
Répétition	472,49	2	236,25	2,60 NS
Aptitude générale.	7 813,98	9	868,22	9,57 (**)
Aptitude particulière au croisement	2 106,90	35	60,19	0,67 NS
Résiduelle	7 803,49	88	90,73	
Liée aux différences	22 852,59	135		
Effet différentiel	11 838,59	9	1 315,39	13,92 (**)
Effet différentiel particulier	2 699,77	36	74,99	0,79 NS
Résiduelle	8 314,23	90	94,47	
Total	41 049,45	269		

TABLEAU 13

Interfertilité des familles. Résultats de l'analyse de la variance du nombre moyen de graines par gousse

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	458,14	134		
Répétition	2,22	2	1,11	0,86 NS
Aptitude générale.	291,65	9	32,40	24,98 (**)
Aptitude particulière au croisement	52,79	35	1,51	1,16 NS
Résiduelle	111,55	88		
Liée aux différences	374,33	135		
Effet différentiel	196,12	9	21,79	12,82 (**)
Effet différentiel particulier	28,66	36	0,80	0,47 NS
Résiduelle	149,55	90	1,69	
Total	832,47	269		

N.S. : non significatif.
(**) : significatif à 1 p. 100.

TABLEAU 14

Classement des familles en groupes pour les différents indices étudiés en fonction de l'effet femelle (α_i)

Indice \ Classement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fréquence de formation des gousses	+ 6,33	+ 5,12	+ 3,38	+ 2,60	+ 2,46	— 1,25	— 1,27	— 5,07	— 5,29	— 7,01
	VII	V	X	VI	IX	VIII	IV	II	III	I
Nombre moyen de graines par gousse	+ 1,47	+ 1,35	+ 1,27	+ 0,63	+ 0,54	+ 0,37	— 0,59	— 0,60	— 1,22	— 2,08
	VII	VI	VIII	III	V	X	IV	IX	II	I
Nombre moyen de graines par fleur	+ 1,65	+ 1,31	+ 0,70	+ 0,49	+ 0,26	+ 0,08	— 0,47	— 0,61	— 1,32	— 2,08
	VII	VI	V	X	III	VIII	IX	IV	II	I

TABLEAU 15

Classement des familles en groupes pour les différents indices étudiés en fonction de l'effet mâle (β_i)

Indice \ Classement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fréquence de formation des gousses	+ 6,54	+ 5,50	+ 4,72	+ 4,69	+ 3,92	+ 3,66	+ 2,57	— 6,85	— 9,45	— 15,31
	V	VII	X	VIII	III	I	II	IV	VI	IX
Nombre moyen de graines par gousse	+ 0,89	+ 0,87	+ 0,74	+ 0,49	+ 0,33	+ 0,11	— 0,02	— 0,47	— 1,07	— 1,87
	V	VII	X	III	I	VIII	II	VI	IV	IX
Nombre moyen de graines par fleur	+ 1,08	+ 1,01	+ 0,82	+ 0,55	+ 0,42	+ 0,29	+ 0,04	— 0,81	— 1,20	— 2,20
	V	VII	X	III	I	VIII	II	VI	IV	IX

N.B. : Les familles dont les numéros sont réunis par un même trait ne diffèrent pas de façon significative.

L'effet femelle désigne, sur la plante entière, l'aptitude de la partie femelle du sporophyte à être traversée par des tubes polliniques, mais aussi la capacité de la famille à fournir des ovules fonctionnels, à être fécondée et à produire des graines. La fertilité femelle présente donc des aspects complexes qui ne peuvent aucunement être réduits aux rapports style-pollen durant les premières étapes de la reproduction, et il n'est pas étonnant que la fertilité femelle ne puisse pas être prédite par la simple estimation sur styles excisés.

b) *La fertilité mâle*

Les corrélations entre les effets mâles estimés à partir des différents indices de mesure de l'interfertilité (la fréquence de formation des gousses, le nombre moyen de graines par gousse et le nombre moyen de graines par fleur) et la croissance pollinique *in vitro* sont toutes significatives. L'aptitude à la croissance du pollen est donc un facteur déterminant de la valeur mâle en croisement à la maturation. (tabl. 16) Les corrélations entre la croissance pollinique *in vitro* et les effets

TABLEAU 16

Relations entre la croissance pollinique in vitro *et les effets mâles* (β_i) *estimés à partir des différentes mesures de l'interfertilité* in vivo *et semi* in situ. *Estimations des coefficients de corrélation.*

	Croissance pollinique à 1 h	Croissance pollinique à 2 h
Effet mâle estimé à partir de la fréquence de formation des gousses	0,70 (*)	0,65 (*)
Effet mâle estimé à partir du nombre moyen de graines par gousses	0,81 (**)	0,76 (**)
Effet mâle estimé à partir du nombre moyen de graines par fleur	0,78 (**)	0,74 (*)
Effet mâle estimé à partir de la mesure semi *in situ* à 5 h	0,53 NS	0,69 (*)
Effet mâle estimé à partir de la mesure semi *in situ* à 6 h	0,45 NS	0,61 NS

N.B. : Les coefficients de corrélation sont estimés avec 8 ddl.
NS : non significatif; (*) significatif à 5 p. 100; (**) significatif à 1 p. 100.

mâles estimés à partir des mesures semi *in situ* ne sont pas significatives, mais leurs valeurs sont élevées.

Si le faible nombre de degrés de liberté ne permet pas toujours de mettre en évidence des corrélations significatives, il semble néanmoins exister une liaison positive entre la longueur des tubes polliniques et leurs fréquences de sortie à travers les styles excisés.

Enfin les corrélations entre les effets mâles estimés à partir de la fréquence de formation des gousses et la fréquence des styles excisés traversés par des tubes

polliniques après six heures d'incubation sur les moyennes de familles ($r = 0{,}70$, 8 ddl) et sur les valeurs individuelles ($r = 0{,}56$,28 ddl) sont significatives.

La forte corrélation entre les effets mâles estimés à partir des mesures de l'interfertilité *in vivo* et la croissance pollinique *in vitro* apporte un argument en faveur de l'absence d'interaction entre le pollen et le style et confirme l'analyse des résultats en semi *in situ* et *in vivo* où les interactions entre familles n'étaient pas significatives.

L'effet moyen d'un génotype mâle à la maturation dépendrait, alors, essentiellement de l'aptitude du pollen à croître et traverser le style et cette aptitude peut être prédite soit par mesure *in vitro* soit en semi *in situ*.

c) *Comparaison de la fertilité en croisement* in vivo *et semi* in situ

Pour comparer les deux types de mesure de la production en croisements, une étude statistique selon le modèle d'analyse des associations binaires a été réalisée sur les différences entre les fréquences de formation des gousses et les fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques six heures après la pollinisation.

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent des effets principaux (aptitude générale et effet différentiel) hautement significatifs, un effet répétition significatif tandis que les interactions ne le sont pas (tabl. 17).

Si, en première analyse le produit d'un croisement est considéré comme un ensemble d'évènements successifs, la nouvelle variable : différence entre les fréquences de formation des gousses et de styles excisés traversés par des tubes polliniques, désignerait à la fois l'aptitude de la famille à fournir des ovules fonctionnels, à être fécondée et à produire des graines mûres à partir de ces ovules. L'existence

TABLEAU 17

Étude des différences entre les mesures de l'interfertilité in vivo (*estimée par la fréquence de formation de gousses*) *et semi* in situ (*estimée par la fréquence de styles traversés par des tubes polliniques après 6 h d'incubation*). *Résultats de l'analyse de la variance.*

Source de variation	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liée aux sommes	29 409,19	134		
Répétition	1 391,40	2	695,70	3,65 (*)
Aptitude générale.	5 143,45	9	571,50	2,91 (**)
Aptitude particulière	5 649,60	35	161,42	0,83 NS
Résiduelle	17 224,74	88	195,73	
Liée aux différences	40 649,70	135		
Effet différentiel	15 460,26	9	1 717,80	8,9 (**)
Effet différentiel particulier.	7 937,00	36	220,47	1,15 NS
Résiduelle	17 252,44	90	191,70	
Total	70 058,89	269		

N.S. : non significatif; (*) : significatif à 5 p. 100; (**) significatif à 1 p. 100.

d'effets principaux hautement significatifs montre que la différence entre les deux mesures de la fertilité varient selon les familles.

Les paramètres auxquels conduit l'étude des relations style-pollen n'ont, donc, pas la même signification que ceux établis dans l'analyse de l'interfertilité *in vivo* (DATTÉE 1975; ABDELKEFI, 1978).

La permessivité représente les rapports entre le gamétophyte mâle et la partie femelle du sporophyte au cours des premières étapes de la reproduction, mais ne couvre pas tous les phénomènes qui aboutissent à la production de gousses, appréciés globalement par l'aptitude générale au croisement, à la maturation.

Les corrélations entre les effets femelles estimés à partir des différents indices de mesure de l'interfertilité (fréquence de formation des gousses, nombre moyen de graines par gousse et nombre moyen de graines par fleur), et des différences entre les fréquences de formation des gousses et de styles excisés traversés par des

TABLEAU 18

Relations entre les effets femelles estimés à partir des mesures de l'interfertilité in vivo *ou semi* in situ *et les différences entre les 2 types de mesures. Estimations des coefficients de corrélation*

	Fréquence de formation des gousses	Nombre moyen de graines par gousse	Nombre moyen de graines par fleur	Fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques après 6 h
Différences entre fréquences de formation des gousses et de styles excisés traversés par tubes polliniques	F 0,67 (*)	F 0,63	F 0,66 (*)	F — 0,75 (*)
	I 0,66 (**)			I — 0,76 (**)

N.B. — F : Familles. I : Individus.
Les coefficients de corrélations sont estimés avec 8 ddl pour les moyennes de familles et 28 ddl pour les valeurs Individuelles.
(*) : Significatif à 5 p. 100.
(**) : Significatif à 1 p. 100.

tubes polliniques sont significatives au seuil de 0,05 (tabl. 18). La liaison qui vient d'être dégagée indique, que plus la différence entre la fréquence de formation des gousses et la fréquence de sorties de tubes polliniques sur styles excisés est élevée, meilleur est l'effet femelle.

Discussion

Le rôle du parent mâle apparaît essentiellement lié à l'aptitude à la croissance pollinique dès les premières heures qui suivent la pollinisation. Cette aptitude pouvant par ailleurs être estimée par une culture sur milieu gélosé.

Cependant, le rôle du parent femelle ainsi que la relation entre les parents mâle et femelle apparaissent plus complexes et l'étude des styles excisés permet de les préciser.

Lorsque les pistils sont sectionnés à deux millimètres environ de la base du stigmate, les fréquences des styles courts présentant des sorties de tubes polliniques, trois heures après la mise en culture, varient de 0,8 à 1 quelque soit le mode de pollinisation (ABDELKEFI, 1978). Pendant les premières heures suivant la pollinisation les relations style-autopollen seraient donc de même nature que celles qui régissent le style et l'allopollen.

En allopollinisation la présence de pollen étranger induirait ensuite une facilitation à la pénétration des tubes polliniques dans les tissus femelles qui se traduit par une évolution de la permissivité en fonction du temps.

La longueur du style pourrait expliquer l'évolution de la permissivité. Des longueurs de styles différentes ont, en effet, été observées au cours des manipulations, mais aucune analyse n'a été effectuée pour distinguer les familles. DRAGAN (1978) a mis en évidence des différences significatives de la longueur du style entre quelques génotypes mâles stériles et il a obtenu une liaison négative entre la longueur du style et le nombre de graines par gousse. L'évolution des fréquences de sortie de tubes polliniques en fonction du temps serait, selon DEBRAND (1976), conditionnée par deux facteurs : l'aptitude à la croissance pollinique du génotype et la distance à parcourir dans les tissus femelles pour atteindre la cavité ovarienne. Ces deux observations tendent à montrer que la longueur du style intervient dans le processus de la fécondation. Mais une intervention simplement « mécanique » est insuffisante pour expliquer le développement constant de l'autopermissivité entre cinq et six heures (ABDELKEFI, 1978) et l'évolution de la permissivité entre les deux temps de mesure. Des facteurs dynamiques semblent conditionner l'élongation des tubes polliniques dans les tissus femelles surtout en allopollinisation.

Lors de la mise au point de la technique d'étude semi *in situ*, nous avons constaté la nécessité de la présence d'ovules pour obtenir des tubes polliniques à la base des styles excisés aussi bien en auto- qu'en allopollinisation.

Les valeurs moyennes de fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques en allopollinisation (moyenne générale 0,54 après 5 h et 0,61 après 6 h sont très nettement inférieures aux valeurs moyennes de l'interfertilité *in vivo* mesurée par la fréquence de formation des gousses, moyenne générale 0,85). Par contre après autopollinisation, les valeurs moyennes de fréquences de styles excisés traversés par des tubes polliniques ne font pas apparaître cette différence (moyenne générale de l'autopermissivité 0,34 après 5 h et 0,37 après 6 h, moyenne générale de l'autofertilité *in vivo* 0,38).

On peut donc exclure l'hypothèse d'un simple traumatisme lié à l'excision qui se manifesterait exclusivement sur les styles allopollinisés. Cependant ces différences de valeurs moyennes permettent de supposer l'intervention d'une attractivité ovulaire sur l'élongation des tubes polliniques qui s'exercerait préférentiellement sur l'allopollen.

Cette hypothèse est, d'ailleurs, conforme aux résultats de SHIPE *et al.* (1972) qui ont mis en évidence chez la Luzerne un effet des tissus femelles sur la croissance pollinique *in vitro ;* une ou plusieurs substances diffuseraient des tissus femelles dans le milieu de culture et influenceraient la croissance pollinique.

Par ailleurs la liaison, entre l'effet femelle estimé à partir des différences entre les mesures *in vivo* et semi *in situ* de l'interfertilité et l'effet femelle estimé en fonction du nombre moyen de graines par gousse, indique que plus la plante produit de graines et plus la différence entre la fréquence de formation des gousses et la fré-

quence de sortie de tubes polliniques sur styles excisés est élevée. Cette liaison apporte un nouvel argument en faveur de la définition de l'effet femelle comme une aptitude à fournir des ovules fonctionnels et à produire des graines mûres, et elle indique, aussi, qu'un effet femelle élevé entraîne une attractivité ovulaire élevée.

Ces observations rejoignent celle de SCHWEMMLE (1968) sur les Œnothères qui met en évidence des substances secrétées par les ovules capables d'attirer ou de repousser les tubes polliniques selon leur structure génétique.

Chez la Luzerne, les ovules auraient un rôle actif sur la croissance de l'allopollen qui recevrait une stimulation plus importante si le pistil est entier; par contre, ils auraient un rôle relativement moins marqué sur la croissance de l'autopollen à travers le style.

Le dosage du nombre d'ovules présents peut, en effet, avoir une influence sur la fréquence de styles excisés traversés par des tubes polliniques. Un style excisé comporte une partie de l'ovaire avec deux ovules, leur pouvoir attractif serait plus faible que celui de l'ensemble des ovules d'un pistil entier, et la sous estimation des valeurs moyennes en styles excisés après allopollinisation par rapport aux valeurs moyennes obtenues en croisement à la maturité, se trouverait ainsi expliquée.

Cette interprétation ne représente qu'un schéma, le contrôle de la croissance pollinique à travers le style est certainement plus fin.

En effet, les familles ayant un mauvais effet femelle en croisement (exemple : II, III et VIII) fournissent, après autopollinisation, en styles excisés des résultats supérieurs à ceux obtenus à la maturation. Dans ce cas le rôle neutre des ovules entraîne une croissance pollinique passive. En revanche les familles, qui présentent un bon effet femelle en croisement (exemple : V, VI et VII), fournissent, après autopollinisation, en styles excisés des résultats inférieurs à ceux obtenus à la maturité.

Le rôle attractif des ovules pourrait donc jouer aussi en partie sur l'autopollen lorsque les familles ont une très bonne fertilité femelle.

Par ailleurs les relations entre les ovules et le pollen pourraient être liées à l'apparentement entre le style et le pollen.

Si la famille n'est pas consanguine, la diversité allélique de l'ensemble style-pollen permettrait l'expression d'une attractivité non nulle sur l'autopollen fonction éventuelle de la fertilité femelle en croisement et l'autofertilité moyenne élevée des familles hybrides serait ainsi expliquée. Par contre, pour une famille consanguine, l'attractivité ovulaire sur l'autopollen pratiquement nulle associée à une très faible valeur pollinique conduisent à une faible autofertilité. Comme en croisement aucune relation entre les tissus femelles et le gamétophyte mâle n'est introduite, l'interfertilité peut être élevée car l'attractivité ovulaire de plantes inbred s'exercerait sur l'allopollen.

L'absence d'interactions entre les familles indiquerait que l'attractivité ovulaire s'exerce en moyenne d'une manière aveugle quelque soit l'allopollen, il peut néanmoins exister des régulations plus fines au niveau des couples d'individus et il serait intéressant de rechercher des interactions entre familles inbred susceptibles de fournir des cribles plus sélectifs que des familles hybrides. Enfin l'étude comparative de croisements entre apparentés permettrait de dégager le niveau d'apparentement à partir duquel l'attractivité l'emporte sur la croissance passive.

Conclusion

L'étude dynamique des rapports entre le gamétophyte mâle et la partie femelle du sporophyte par la méthode semi *in situ* a permis de préciser certains mécanismes de la reproduction.

La mise en évidence d'un rôle attracteur des ovules sur l'allopollen n'exclue pas la possibilité d'une régulation fine qui s'exercerait sur la croissance pollinique à travers le style.

L'avantage sélectif du pollen hétérozygote pourrait provenir en partie d'une très grande souplesse de réponse à la stimulation ovulaire quelque soit la structure génétique de la plante femelle, tandis qu'un pollen plus consanguin répondrait à des stimulations beaucoup plus spécifiques; réciproquement, des ovules ou des ovaires issus de plantes héterozygotes pourraient exercer une attractivité peu nuancée sur les gamétophytes mâles, tandis que des femelles inbred cribleraient de façon plus stricte; une telle hypothèse expliquerait certains résultats qui semblent montrer que des femelles inbred (à condition qu'elles ne soient pas trop limitantes pour leur fertilité femelle), révèlent mieux les différences entre structures polliniques que des femelles hybrides simples ou hybrides doubles (DATTÉE, 1975).

Au fur et à mesure que les connaissances sur la biologie de la reproduction de la Luzerne augmentent, on saisit la finesse des mécanismes mis en jeu et la souplesse qu'ils confèrent à l'espèce.

En effet, ce système de reconnaissance qui s'exprime par une attractivité ovulaire liée à la nature du pollen et vraisemblablement à la structure génétique de la plante renforce les barrières mécaniques à l'autofécondation (à savoir le déclenchement de la fleur et la rupture de la membrane stigmatique) et permet ainsi le maintien de l'hétérozygotie chez une espèce allogame où le système d'incompatibilité n'est pas strict.

Cependant, dans des conditions limitantes, lorsque le nombre de plantes est restreint ou bien lorsque le vecteur de la fécondation croisée est absent, l'espèce disposera de la possibilité d'une reproduction autogame pour se maintenir.

L'apport de cette étude pour les schémas de sélection est important, car les relations entre géniteurs conditionnent le résultat des transformations des structures génétiques réalisées lors des reproductions sexuées.

Par ailleurs, l'étude des relations style-pollen par la méthode semi *in situ* peut trouver des applications diverses. Cette technique déjà utilisée pour l'étude des caractères de fertilité de génotypes mâles stériles et mainteneurs a fourni des résultats conformes à ceux obtenus dans ce travail (DEBRAND, 1976). La méthode d'étude semi *in situ* peut aussi être appliquée à l'étude des mécanismes de l'autogamie chez les espèces annuelles du genre *Medicago*.

Les styles excisés peuvent aussi être utilisés dans l'étude des relations interspécifiques, cette technique pourrait, alors, apporter des renseignements sur les réactions d'incompatibilité entre espèces, comme elle peut être un très bon outil d'analyse des sélections gamétiques.

En effet, la technique des styles excisés, en permettant une approche dynamique et une appréciation relativement fine des modes de reproduction, autorise une étude générale de la structure génotypique des espèces.

Reçu pour publication en décembre 1979.

Remerciements

Je tiens à remercier Mme DATTÉE pour l'intérêt qu'elle a réservé à ce travail.

Summary

Analysis of the fertility parameters in in vivo *and semi* in situ *crossing in Alfalfa* (Medicago sativa *L.*)

Ten single cross families of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) represented each by three full sibs (i.e. 3 repetitions of 10 genotypes) have been chosen for the study of :

— Pollen tube growth *in vitro;*

— the analysis of style-pollen relations in semi *in situ* (ABDELKEFI, 1980);

— the cross-fertility in the whole plant.

All the genotypes of a repetition are used as male and female parents in *in vivo* and semi *in situ* crosses.

An exised style with pollen tubes at its bases may be considered as a potential pod. According to this hypothesis, the two parameters of male and female fertilities have been estimated :

— on exised styles, after the first hours following pollination,

— after the ripening of crossing products.

This study:

— reveals a close link between pollen tube growth *in vitro* and the male value in crossings;

— precises that female fertility shows intricated aspects which may not be limited to style — pollen relations only during the first steps of reproduction;

— provides arguments for the absence of interaction between pollen and style;

— reveals the influence of ovules on the pollen tube growth through the style.

The ovule attractivity is active on allo — pollen preferentially.

On the contrary, the self pollen tube growth accross the style seems to be passive enough.

The ovule attractivity depends on the degree of relationship between style and pollen. A recognition signal connected to the nature of the style and the pollen is set up during the pollen tube growth through the style.

The mechanisms reinforce the mechanical barriers to self fertilization (tripping of the flower, disruption of the stigma membrane) and, thus, the maintenance of the heterozygoty in an allogamous species in which the incompatibility system is not strict.

Références bibliographiques

ABDELKEFI A., 1978. *Valeur pollinique et fertilité femelle à différentes étapes de la reproduction chez la Luzerne.* (Medicago sativa *L.*). Thèse 3e cycle — Université Paris Sud, Orsay, 119 p.

ABDELKEFI A., 1980. Technique d'étude en semi *in situ* des relations style-pollen chez la Luzerne (*Medicago sativa L.*). *Ann. Amélior. Plantes*, **30** (3), 271-284.

BARNES D. K., CLEVELAND R. W., 1963. Pollen tube growth of diploid Alfalfa *in vitro. Crop Sci.*, **3**, 291-294.

BARNES D. K., CLEVELAND R. W., 1972. Interrelationship of temperature, sugar concentration, and pollen parent on Alfalfa pollen germination and tube growth *in vitro. Crop Sci.*, **12**, 796-799.

CHALBI N., 1969. *Contribution à l'étude des phénomènes d'interaction biologique entre génotypes en association et leur interprétation biométrique.* Thèse-Doct. d'État. Fac. Sc. Paris, 111 p.

CORNUET J. M., 1974. *Étude de la compétition pollinique chez quelques génotypes de Luzerne.* Rapport D.E.A., E.N.S. Paris.

DANE F., MELTON B., 1973. Effect of temperature onself and Cross compatibility and *in vitro* pollen growth characteristics in Alfalfa. *Crop Sci*, **13**, 587-591.

DATTÉE Y., 1975. *Facteurs génétiques liés à l'auto- et à l'interfertilité chez* Medicago sativa *L.* Thèse doctorat d'État. Université Paris VI.

DEBRAND M., 1976. *Étude comparée de la fertilité femelle de mâles stériles en croissement avec des mainteneurs et des pollinisateurs témoins chez la Luzerne.* (Medicago sativa *L.*) Mémoire de fin d'études. I.N.R.A. Lusignan ENS. Paris.

DEBRAND M., CORNUET J. M., DATTÉE Y., GUY P., 1979. Étude *in vitro* de la compétition pollinique chez quelques génotypes de Luzerne (*Medicago sativa* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, **29** (1), 63-77.

DEMARLY Y., 1963. Génétique des tétraploïdes et amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes*, **13**, 307-408.

DRAGAN DJUKIC, 1978. *Étude de quelques caractéristiques morphologiques de fertilité chez différentes origines mâles stériles de Luzerne.* (Medicago sativa *L.*). Rapport de stage I.N.R.A. Lusignan.

GALLAIS A., 1970. Modèle pour l'analyse des relations d'associations binaires. *Biometr. Praxim.*, 11-23, 51-80.

GARTNER A., DAVIS R. L., 1966. Effects of self-compatibility on chance crossing in *Medicago sativa* L. Crop Sci., **6**, 61-63.

MILLER M. K., SCHONHORST M. H., 1968. Pollen growt of Alfalfa *in vitro* as influenced by grouping of grains on the medium and greenhouse versus field sources. *Crop Sci.*, **8**, 525-526.

RICE J., WANG Cl. et GRAY E., 1970. Relationship of pollen and pistil characteristics with self and cross compatibility in Alfalfa. *Crop Sci.*, **10**, 59-61.

SCHWEMMLE J., 1968. Selective fertilization in *Œnothera. Advan. Genet.*, **14**, 226-324.

SHIPE E. R. *et al.*, 1971. Influence of excised pistils on *in vitro* growth of Alfalfa pollen. *Crop Sci.*, **11**, 398-399.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 309-319.

Relationship between ecological adaptation and carbohydrate reserve evolution for two different varieties of *Lolium perenne* L.

S. ARCIONI (*), D. MARIOTTI (*), M. FALCINELLI (**) and S. CECCARELLI (**)

(*) *Centro di Studio per il Miglioramento Genetico delle Piante Foraggere*
c/o Istituto di Allevamento Vegetale
Facoltà di Agraria
Borgo XX Giugno
Perugia (Italia)
(**) *Istituto di Allevamento Vegetale*
Facoltà di Agraria
Borgo XX Giugno
Perugia (Italia)

Summary

Previous papers have demonstrated that varieties of *Lolium perenne* and *Dactylis glomerata*, when moved out of their area of adaptation, expecially in latitudinal sense, are less persistent than adapted varieties. A trial has been carried out at Perugia (Central Italy) in order to gain information on the relationships between root development, carbohydrate reserve content and persistence in two differently adapted varieties of *Lolium perenne*, « Premo » and « Vejo ».

The results obtained show that the not adapted variety is characterized by higher value of green matter production, root dry matter and water soluble carbohydrate (WSC) content than the adapted variety in the first year from sowing. Starting from the second year, the situation is reversed and the adapted variety has higher values than the non adapted variety for all above mentioned parameters.

During the season characterized by drought stress a larger decrease of WSC content is observed in the not adapted type. The variations in the WSC content are discussed in relation to adaptation strategies.

I. — Introduction

Many papers have shown that in Central Italy forage grasses like *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L. are characterized by a different degree of persistence depending upon the geographical origin of the variety (PANELLA *et al.*, 1976; LORENZETTI and FALCINELLI, 1976; FALCINELLI and CECCARELLI, 1977).

The north european varieties of the two species when grown in Central Italy

undergo a very severe thinning: those of *Lolium perenne* disappear in a few years after sowing. Similar observations have been reported by KNIGHT (1966).

The comparison of adapted and non adapted types of *Lolium perenne* and *Dactylis glomerata* also showed that, when a variety is moved out of its area of adaptation, there is an increase of the within variety variability to such an extent that the material could not be uniform enough to be called still a variety (CECCARELLI and LORENZETTI, 1977). It has been assumed that an adapted population, produced by natural selection acting only at phenotypic level, includes several different genotypes which are phenotypically similar (MATHER, 1953); when the population is moved out of its area of adaptation, the different gene combinations will interact with the new environment in different ways giving different phenotypes and, therefore, an explosion of variability. The validity of this assumption has been demonstrated by LUDWIG *et al.* (1953), CLAUSEN and HIESEY (1958) and COOPER (1959).

The observations made in Central Italy may be of interest for all the countries of the Mediterranean Basin and it is believed that the release of varieties based upon ecotypes collected in the Mediterranean Basin will pave the way for new possibilities of persistence and productivity.

While the lack of persistence and the increased variability of non adapted types has been well demonstrated, the inherent causes of thinning in the first years after sowing have not been studied.

The carbohydrate reserves play a determinant role during the regrowth because they are the main source of energy to the plan when, after defoliation, a very limited photosynthetic area is available (WARD and BLASEN, 1961; DAVIDSON and MILTHORPE, 1965; DAVIS, 1965; MILTHORPE and DAVIDSON, 1966; SHEARD, 1968; SMITH, 1974; BOOYSEN and NELSON, 1975; ALBERDA, 1970).

In this paper we report the results of an experiment designed to test the hypothesis that the lack of adaptation of north-european varieties of *Lolium perenne* is related to a progressive depletion of the carbohydrate reserves in the basal stems and in the roots. The hypothesis was suggested by the behaviour of north-european varieties which are not completely summer-dormant when grown in the Mediterranean regions. The small amount of green matter produced at the expense of carbohydrate reserves is rapidly destroyed under the high temperatures and drought characterizing the mediterranean summer (KNIGHT, 1960; SILSBURY, 1961); therefore, the carbohydrate reserves are not restored. By contrast, in an adapted type which is completely summer-dormant, the carbohydrate reserves are not mobilized until the autumn rainfalls. It has to be underlined that differences in the amount of carbohydrates reserves are in turn the result of differences in rate respiration and or photosynthesis as adaptative responses to different climatic stresses.

II. — Materials and methods

The two varieties of *Lolium perenne* which have been studied are « Vejo », a variety adapted to Central Italy and « Premo », a variety bred in Holland; these two varieties have been chosen because they have the same date of ear emergence and therefore the comparisons are not confounded with differences in growth stages. In September 1976, one hundred randomly chosen seeds of each variety were germinated in Petri dishes and 50 one-week old randomly chosen seedlings

were transplanted in pots to obtain an adequate tillering. In December, 30 genotypes were clonally propagated for each variety and 20 plants for each genotype were obtained. The clones were transplanted in wooden boxes (130 cm × 90 cm × 50 cm) dug in the experimental field. Each variety was represented by six rows of five plants; rows were randomized within boxes and spacing was 10 cm in all directions. In each box a plant for each genotype of the two varieties (30 × 2 = 60 plants) was present so that in the twenty boxes the same genetic material was grown.

Starting from May 1977 the plant material was sampled as follows: when the plants were 15 cm high they were cut and the green and dry matter yield per plant were evaluated in all boxes. Plants were cut 3-4 cm above soil level to simulate grazing conditions. At each sampling, the plants of a single, randomly chosen box, were pulled out and after root washing, dry matter weight was determined.

Water soluble carbohydrate (WSC) content in the roots and basal stems was measured according to SMITH and GROTELUESCHEN (1966) using a 90 p. 100 solution of ethanol in order to extract glucose plus fructose and sucrose. Both dry matter and water soluble carbohydrate content were measured on an row basis and, therefore, each determination was made on six replicates for each of the two varieties.

III. — Results and discussion

1. — *Green matter yield*

Figure 1 shows the green matter yield (g /plant) of the two varieties at different samplings from May 16, 1977 to June 12, 1979. During the first year from sowing the not adapted variety (« Premo ») yields more than the adapted variety (« Vejo »), while during the second year the difference becomes gradually smaller and, from May 1978, the green matter yield of « Vejo » is always higher than « Premo ».

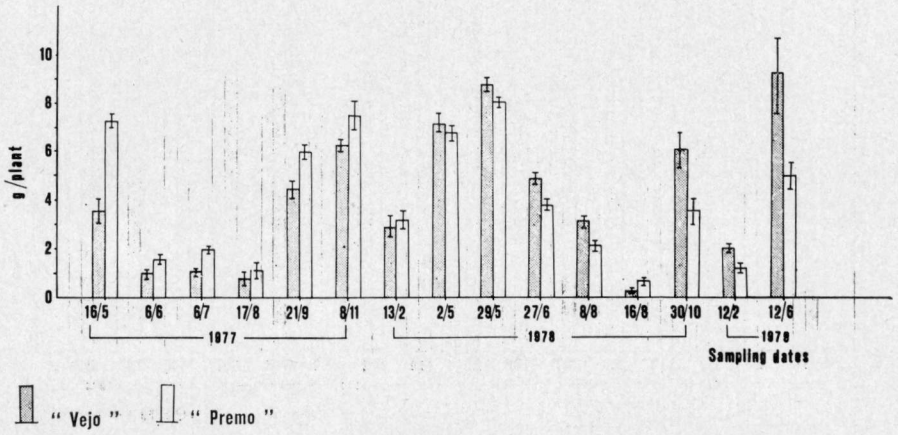


FIG. 1. — *Green matter yield (g /plant) in two varieties of* Lolium perenne *L.*
Production de matière verte (g /plante) chez deux variétés de Lolium perenne *L.*

The differences in green matter yield at the two samplings of August 17, 1977 and August 16, 1978 were supposed to be a consequence of the different level of summer dormancy of the two varieties grown in out climatic conditions. As a matter of fact the amount of dormancy of the plants was evaluated before these two samplings using a score from 1 (complete dormancy) to 9 (active vegetation): the data showed that « Premo » (mean score = 3.5) had a lower level of dormancy than « Vejo » (mean score = 2.5). The green matter yield of « Premo » during summer is presumably accompanied by the consumption of a greater amount of carbohydrate reserves and, since the new leaves produced quickly, become severely wilted, the energy employed for regrowth cannot be replaced by photosynthesis.

2. — *Root dry weight*

The data on roots dry matter (g /plant) are reported in figure 2. In the first year, the variety « Premo » is characterized by a much more expanded root system than « Vejo ». Starting from May 2, 1978 the situation is the opposite and the difference between varieties increases with time. The superiority of « Premo » during the first year partly depends upon its greater 1000-seed weight which ensures a great amount of reserves during early plant growth.

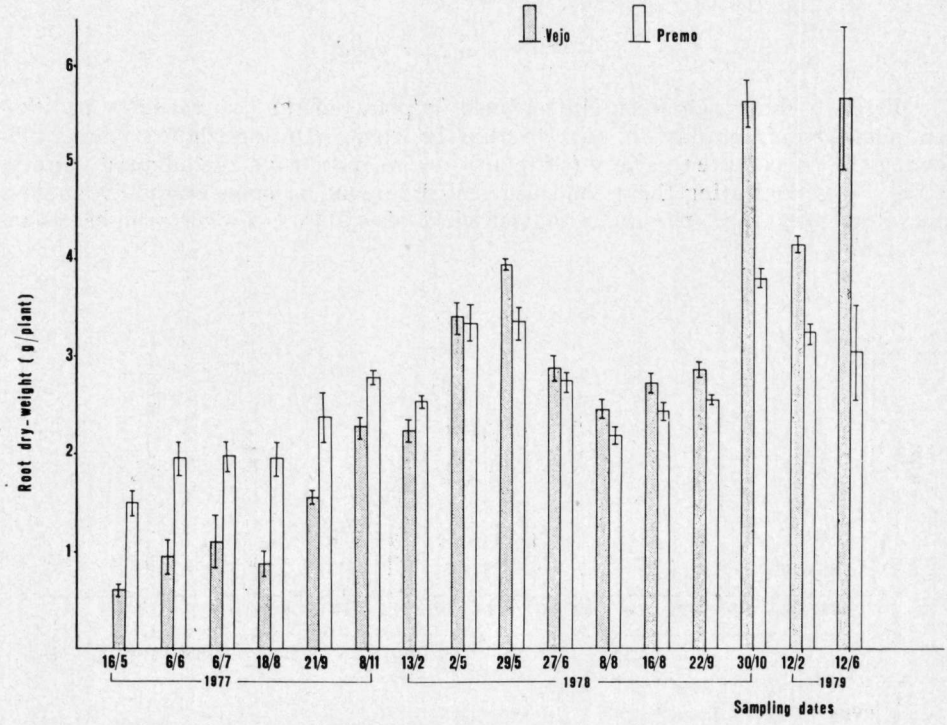


FIG. 2. — *Root dry-weight (g /plant) of two varieties of* Lolium perenne *L.*
Poids sec des racines (g /plante) chez deux variétés de Lolium perenne *L.*

3. — *Total water soluble carbohydrates*

Water soluble carbohydrates (WSC), which include fructans, sucrose, glucose and fructose, evaluated as g /100 g of dry matter are reported in figure 3, which shows a remarkable seasonal change of the WSC concentration with the highest values at the beginning of winter and the lowest in August. Moreover, the pattern of change is different in the two varieties: in the period from May to September 1977, the adapted type is characterized by a higher WSC concentration than the

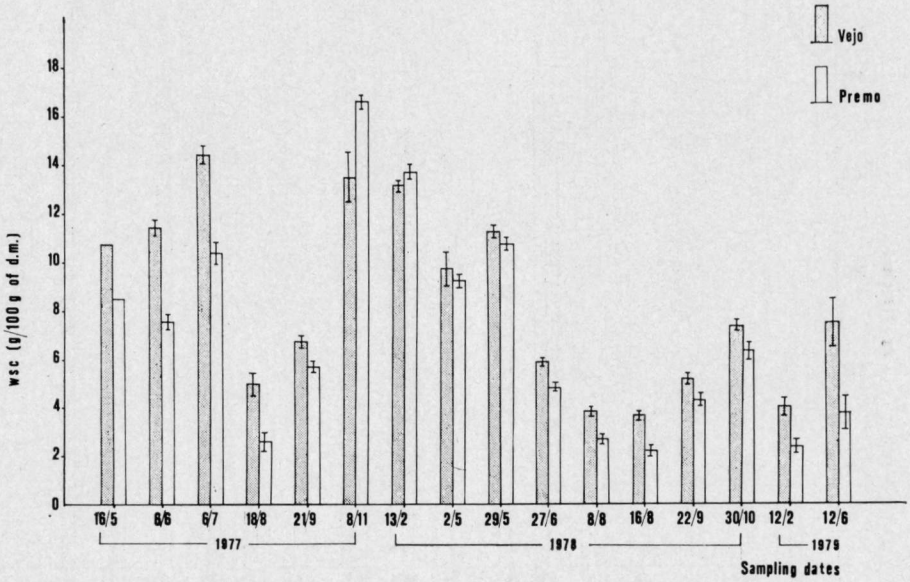


FIG. 3. — *Total water soluble carbohydrates (g /100 g of dry matter) in the roots and basal stems of two varieties of* Lolium perenne *L. Ensemble des hydrates de carbone solubles dans l'eau (g /100 g de matière sèche) pour les racines et pour les tiges de base chez deux variétés de* Lolium perenne *L.*

non adapted type; from February 13, 1978 to May 29, 1978 there are non significant differences between the two varieties. In the subsequent samplings the roots and basal stem portions of « Vejo » contain a higher WSC concentration than « Premo ». The higher WSC concentration shown by the adapted type during the period characterized by severe drought stresses (17 /8 /1977 and 16 /8 /1978) might allow a larger osmotic pressure in the roots and consequently, together with other water transport mechanism, a more efficient water uptake. It is possible that this characteristic represents one of the adaptative strategies of the local type to escape and /or tolerate recurrent drought conditions.

The high WSC content found in the samplings of November 8, 1977 and October 30, 1978 in both varieties may be explained, in terms of adaptation, with an increased cold resistance bound to lowering of the freezing point (BREESE and FOSTER, 1970; POLLOCK and RUGGLES, 1976). As a matter of fact, the proportionally larger increase in « Premo », adapted to North-European countries, during

the first year after sowing (1977), could be assumed as an adaptative feature to the lower winter temperatures prevailing in its area of origin. This situation is not repeated in the second year, because the lack of adaptation interferes negatively with the metabolism of the foreign variety.

BOOYSEN and NELSON (1975) have shown that in *Festuca arundinacea* the regrowth mainly depends upon the total amount of carbohydrates contained in the plant rather than upon their concentration: a plant with a low carbohydrate percentage and a large root system could have a greater energy source than a plant with a high carbohydrate percentage and a small root system.

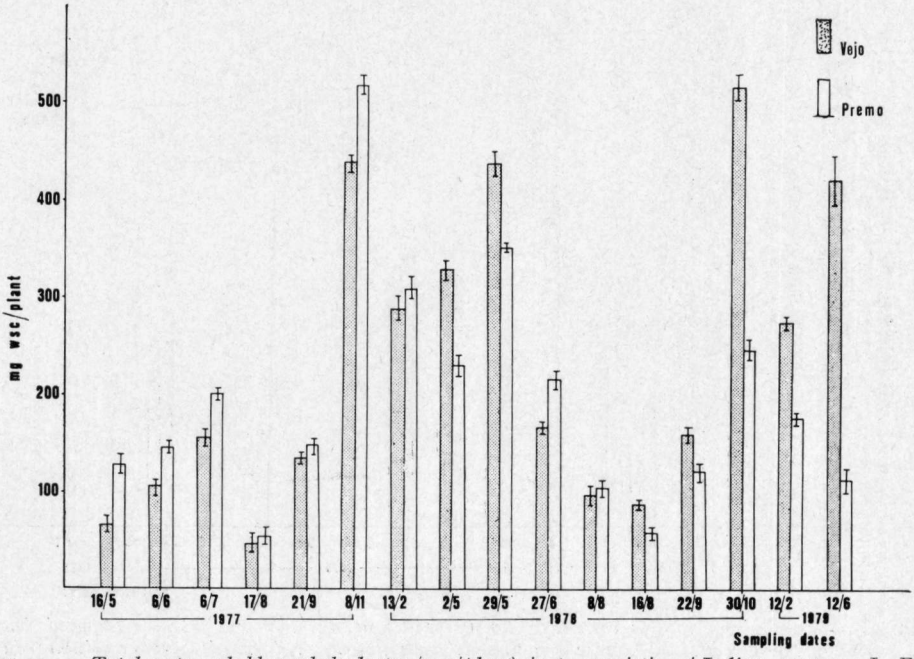


FIG. 4. — *Total water soluble carbohydrates (mg/plant) in two varieties of* Lolium perenne *L. Ensemble des hydrates de carbone solubles dans l'eau (mg/plante) chez deux variétés des* Lolium perenne *L.*

At the samplings of May 16, June 6 and July 6, 1977 the WSC content per plant (roots and stubbles) was higher in « Premo » than in « Vejo » (fig. 4). A sharp decrease in the total water soluble carbohydrates was observed on August 17, 1977; the decrease was proportionally greater in « Premo » than « Vejo », thus supporting the view that green matter yield of « Premo »-which is a little higher than that of « Vejo » during the period of high drought stresses, high temperature and low photosynthetic capacity-causes a decrease in the total root carbohydrate reserves previously accumulated. The increase of the WSC content observed in autumn (September 21 and November 8, 1977) could be explained assuming that the climatic conditions allow a greater green matter yield due to a high photosynthetic activity; this in turn allows the storage of carbohydrate reserves in the roots and basal stem portions.

In the second year it appears that in the majority of the samplings « Vejo » has a higher WSC content per plant than « Premo ». When adaptation becomes

important the local type is presumably characterized by higher photosynthetic activity and increased possibilities of carbohydrate storage.

The data on WSC content in the two samplings of August 1978 seem worthy of mention: in this period the carbohydrate reserves are chiefly utilized for respiration and the higher content of reserves in « Vejo » in the second samplings indicates that the adapted type needs a lower amount of energy to overcome the most critical drought stress. It is likely that in this period the amount of carbohydrate reserves in the not adapted type falls below the critical level which allows autumn regrowth. It may be observed that in the two samplings of September 22, 1978 and October 30, 1978 the recovery of reserves is notably higher in « Vejo » than in « Premo ».

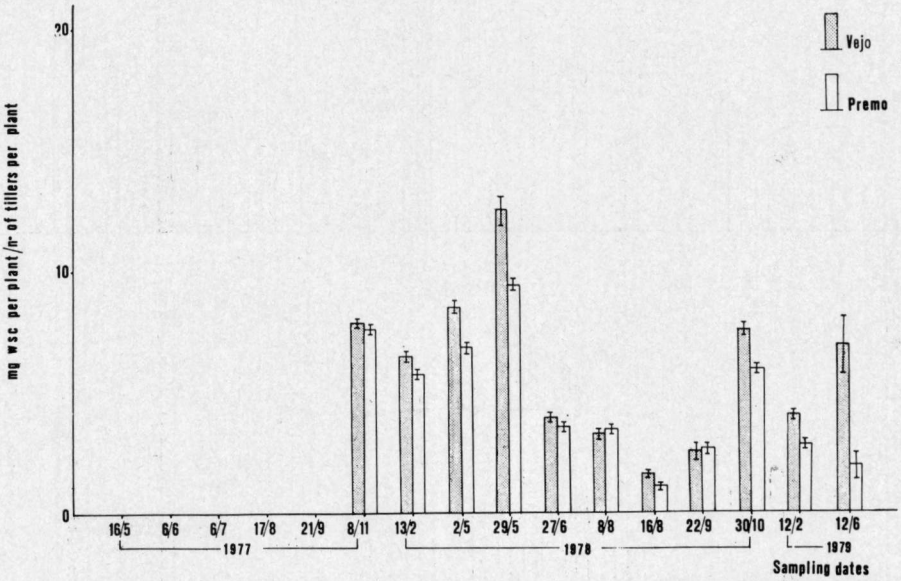


FIG. 5. — *Total WSC content per plant/tiller number per plant in two varieties of* Lolium perenne *L. Quantité totale en hydrates de carbone solubles dans l'eau par plante/nombre de talles pour chaque plante chez deux variétés de* Lolium perenne *L.*

The evaluation of carbohydrate reserves in absolute amount per plant may represent a limitative approach in the case of differences in tiller number in the two varieties. For this reason, the tiller number on a single plant basis has been evaluated from the samplings of November 8, 1977. Figure 5 shows the ratio between the mean values of the WSC plant and the mean tiller number per plant. The adapted type always shows a WSC content per tiller similar or higher than that of « Premo »: this may be assumed as an indication of a higher energy content at disposal for regrowth in the adapted type.

4. — *Fructan, sucrose and glucose plus fructose contents*

Fructan, sucrose and glucose plus fructose contents are reported in figure 6. Fructan are the main components of the soluble carbohydrate reserves and they are considered to be the main reserve material of forage grasses. The fructan

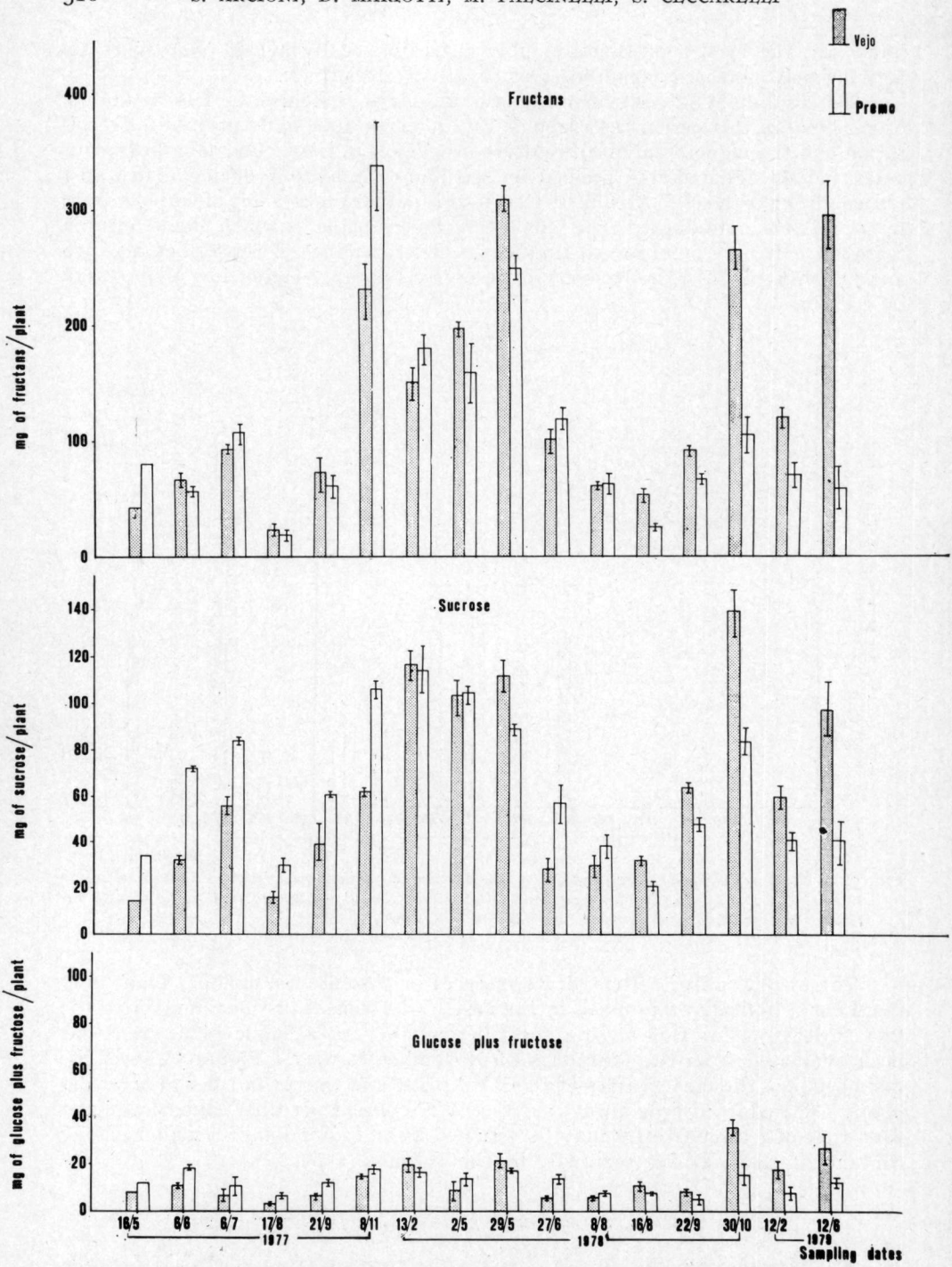


FIG. 6. — *Fructan, sucrose and glucose plus fructose content (mg/plant) in two varieties of* Lolium perenne *L. Teneurs en fructosanes, saccharose et glucose + fructose (mg/plante) chez deux variétés de* Lolium perenne *L.*

content is higher than either sucrose or glucose plus fructose content. Sucrose supplies fructose to growing polyfructan chains.

The pattern of variation of fructan content reflects the total WSC trend (fig. 4) with the exception of the samplings of June 6, 1977 when « Premo », which shows the highest total WSC content, is characterized by a lower fructan content. It may be assumed that a considerable transport towards the roots of photosynthetates takes place in « Premo » in order to restore the reserves which were depleted after the cut of May 16, 1977.

The pattern of variation of sucrose, which is directly utilized for the growth of new shoots is similar to that of the total WSC content.

As far as the glucose plus fructose content is concerned, it is in all cases very low and the differences between the two varieties are always small except in the last two samplings.

IV. — Conclusions

The results obtained in this experiment suggest that carbohydrate reserves may play an important role in determining the behavioural differences between the two differently adapted varieties of *Lolium perenne*, « Vejo » and « Premo ».

The total water soluble carbohydrate content seems to reflect the different adaptative capacities of the two varieties to the conditions of Central Italy. « Premo », which is adapted to lower winter temperatures than « Vejo », stores a greater amount of reserves just before winter; on the contrary, the carbohydrate content of the non adapted type becomes lower than that of the adapted type in summer.

The comparison between the WSC data with those on green matter yield, root dry weight and summer dormancy supports the hypothesis that a north-european variety of *Lolium perenne*, when grown in Central Italy is more productive than adapted varieties in the first year of sowing and is not completely summer dormant. The small green matter yield given in the summer by a north-european variety is accompanied by a great consumption of carbohydrate reserves in the roots and in the basal stem portions: the recovery of the reserves is, on the other hand, very scanty presumably because the photosynthetic efficiency during summer is limited by high temperature and drought.

Since both the growth behaviour and the limiting climatic factors are recurrent, the unability of not adapted types to synchronize their cycle of storage-utilization of carbohydrate reserves with the need to face climatic stresses leads to such a depletion of reserves to determine the death of the plant. It should be underlined, however, that the rhythm of carbohydrate storage-utilization is in turn an effect of the unbalance of other physiological factors such as respiration and /or photosynthesis.

Reçu pour publication en février 1980.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Italo Bernacchia and Mr. Alessandro Pampanelli for their excellent technical assistance.

Résumé

Relation entre l'adaptation écologique et l'évolution des réserves en hydrates de carbone de deux variétés de Lolium perenne *L.*

Des travaux antérieurs ont démontré que les variétés de *Lolium perenne* et de *Dactylis glomerata* transportées hors de leur zone d'adaptation, particulièrement dans le sens de la latitude, sont moins persistantes que les variétés déjà adaptées. Une expérience a été réalisée à Pérouse (Italie centrale) afin de comparer les informations recueillies sur deux variétés de Ray grass anglais (« Premo » et « Vejo ») différemment adaptées en ce qui concerne le développement des racines, les réserves en hydrates de carbone et la persistance.

Les résultats obtenus ont montré que l'année suivant le semis, la variété non adaptée était caractérisée par un rendement supérieur en matière verte, un poids sec des racines plus élevé et une teneur supérieure en hydrates de carbone solubles dans l'eau.

A partir de la seconde année la situation est inversée et la variété adaptée dépasse pour ces paramètres la variété non adaptée. Pendant la période de sécheresse, on assiste, pour la variété non adaptée, à une baisse rapide des hydrates de carbone solubles dans l'eau. Les variations de la teneur en hydrates de carbone solubles dans l'eau par rapport aux stratégies d'adaptation, font l'objet d'une discussion.

References

ALBERDA Th., 1970. The influence of carbohydrate reserves on respiration, photosynthesis and dry matter production of intact plants. *Proc. 11th Intern. Grassland Congr.*, 517-522.

BREESE E. L., FOSTER C. A., 1970. Breeding for increased winter hardiness in perennial ryegrass. *Rep. Welsh. Plant Breed. Stn.* for 1970., 77-86.

BOOYSEN P. V., NELSON J., 1975. Leaf area and carbohydrates reserves in regrowth of tall fescue. *Crop Sci.*, **15**, 262-266.

CECCARELLI S., LORENZETTI F., 1977. Within varieties variability in differently adapted types of *Lolium perenne*. *Proceed.* **13***th Intern. Grassland Congr.*, Leipzig (1-2), 292-297.

CLAUSEN J., HIESEY W. M., 1958. Experimental studies on the nature of the species IV. Genetic structure of ecological races. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, 615, 1.

COOPER J. P., 1959. Selection and population structure in *Lolium* II. Genetic control of date of ear emergence. *Heredity*, **13**, 445-449.

DAVIDSON J. L., MILTHORPE F. L., 1965. Carbohydrate reserves in the regrowth of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) *J. Brit. Grassl. Soc.*, **26**, 15-18.

DAVIES A., 1965. Carbohydrate leves and regrowth in perennial ryegrass. *J. agric. Sci.*, **65**, 213-221.

FALCINELLI M., CECCARELLI S., 1977. Seasonal productivity and persistence of grass varieties in Central Italy. *Proc.* **13***th Intern. Grassl. Cong.*, 251-258.

KNIGHT R., 1960. The growth of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) under spaced plant and sward condition. *Austr. J. Agric. Res.*, **11**, 457-472.

KNIGHT R., 1966. The growth of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) in a winter-rainfall environment. *Proc.* **10***th Int. Grassl. Cong.*, 308-311.

LORENZETTI F., FALCINELLI M., 1976. Valutazione di specie e varietà e direttive per il miglioramento genetico di graminacee foraggere per i pascoli asciutti dell'Italia Centrale. *Riv. di Agron.*, **10**, 94-101.

LUDWIG R. A., BARRALES H. L., STEPPLER H., 1953. Studies on the effect of light on the growth and the development of red clover. *Can. J. agric. Sci.*, **33**, 274-287.

MATHER K., 1953. The genetical structure of populations. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **7**, 66-95.

MILTHORPE F. L., DAVIDSON J. L., 1966. Physiological aspects of regrowth in grasses; in "*The Growth of cereals and Grasses*". F. L. Milthorpe and J. D. Ivins Eds. Butterworths, London. 241-255.

PANELLA A., LORENZETTI F., CECCARELLI S., 1976. Growth rhythm and productivity of differently adapted types of forage species. *Report of Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Roskilde, 7-9 sept. 1976, 111-118.

POLLOCK J. C., RUGGLES P. A., 1976. Cold-induced fructosan synthesis in leaves of *Dactylis glomerata*. *Phytochemistry*, **15**, 1643-1646.

SILSBURY A., 1961. A study of dormancy survival and other characteristic in *Lolium perenne* L. at Adelaide, *S.A. Austr. J. Agric. Res.*, **14**, 1-9.

SHEARD R. W., 1968. Influence of defoliation and nitrogen on the development and the fructan composition of the vegetative reproductive system of timoty (*Phleum pratense* L.) *Crop Sci.*, **8**, 56-60.

SHEARD GROTELUESCHEN R. D., 1966. Carbohydrate in grasses I. Sugar and fructose composition of the stem bases of several northern adapted grasses at seed maturity. *Crop Sci.*, **6**, 263-267.

WARD C. Y., BLASEN R. E., 1961. Carbohydrate reserves and leaf area in regrowth of orchardgrass. *Crop Sci.*, **1**, 366-370.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (3), 321-344.

Effets génétiques observés sur des plantes de Tabac régénérées à partir de cotylédons par culture *in vitro*

Martine BARBIER et H. L. DULIEU

Laboratoire de Mutagenèse,
Station d'Amélioration des Plantes,
Centre de Recherches de Dijon, I.N.R.A.,
B. V. 1540, 21034 Dijon-cedex

Résumé

Afin d'estimer la part de variabilité préexistante dans les cellules différenciées et la part due à la multiplication *in vitro*, des plantes ont été régénérées à partir de cotylédons : (1) directement, (2) à partir de colonies provenant de protoplastes et (3) après induction de cultures de tissus soumises à un nombre variable de passages *in vitro*. Les spectres de variations obtenus dans ces différents cas ont été comparés. Ces comparaisons ont permis de montrer que les variants apparaissent à une fréquence très élevée, sauf en régénération directe. Certains variants portant sur la coloration des cellules du parenchyme palissadique, due à la présence des marqueurs a_1^+/a_1 yg^+/yg, apparaissent d'emblée à fréquence élevée. D'après l'homogénéité des plantes régénérées à partir de chacune des colonies cellulaires issues de protoplastes isolés et d'après l'évolution des fréquences des variants de couleur au cours des trois transferts *in vitro*, on peut conclure qu'ils sont présents au plus tôt dans les cellules différenciées et qu'ils sont multipliés par la culture *in vitro*. D'autres types de variants (instables chlorophylliens et variants morphologiques) semblent apparaître au cours de la multiplication cellulaire indifférenciée *in vitro*.

Introduction

L'origine de ce travail est l'envoi dans l'espace de graines de Tabac afin de déceler les modifications génétiques éventuelles dues au rayonnement cosmique.

Le matériel devait permettre de voir les variations de coloration des cellules du parenchyme palissadique grâce à deux marqueurs géniques à l'état hétérozygote. Or, les nombres de variations observées sur les feuilles des plantes issues des graines traitées (exposées au rayonnement cosmique) et non traitées (restées au sol) n'ont pas été significativement différents l'un de l'autre. Cette observation n'est pas étonnante du fait que l'effectif cellulaire de l'épicotyle donnant naissance à la pousse feuillée est très faible, de l'ordre de dix cellules dans l'assise t_2 (DULIEU, 1965).

On a donc cherché à exprimer le génotype des cellules cotylédonaires, beaucoup plus nombreuses que les cellules à l'origine des feuilles, en transformant en cultures de cellules les cotylédons irradiés dont on disposait; les colonies ont ensuite été régénérées en plantes.

La fréquence et la diversité des variants obtenus, par rapport à la stabilité du témoin issu directement de graines, ont conduit à chercher la part de variabilité due à la culture *in vitro*. On a donc fait une série d'expériences en culture de tissus avec des cotylédons témoins (non irradiés) afin de préciser à la fois le degré d'homogénéité du témoin et l'effet de la durée de la culture *in vitro* sur le même spectre de variations.

L'analyse des cellules cotylédonaires en conditions de régénération rapide a été entreprise pour compléter les expériences en culture de tissus. Les deux protocoles expérimentaux suivis pour obtenir une régénération rapide sont l'obtention de bourgeons : (1) directement à partir de cotylédons et (2) à partir de colonies provenant de protoplastes isolés de cotylédons.

Matériel et méthodes

1. — *Matériel végétal*

Le matériel utilisé est un hybride intervariétal de *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi n.c. (a_1/a_1) × var. NC 95 (yg/yg). Les plantes homozygotes a_1/a_1 ont une synthèse chlorophyllienne déficiente; elles sont jaune clair. Les plantes homozygotes yg/yg sont vert clair. Le génotype initial est donc hétérozygote pour deux gènes marqueurs intervenant dans la différenciation des cellules chlorophylliennes ainsi que pour des caractères morphologiques qui diffèrent entre les variétés parentales. L'hybride a des feuilles de couleur jaune-vert, correspondant au génotype a_1^+/a_1 yg^+/yg (Dulieu *et al.*, 1971; Dulieu, 1974, 1975).

2. — *Méthodes de régénération*

2.1. — *Régénération directe de bourgeons à partir de cotylédons* (Voie 0).

On a prélevé aseptiquement les cotylédons de dix plantules hybrides et ceux-ci ont été placés directement sur un milieu qui permet la différenciation de bourgeons (milieu de régénération). Sa composition est la suivante : macro- et microéléments de Murashige et Skoog (1962), vitamines B, saccharose (30 g/l), glutamine (200 mg/l), inositol (100 mg/l), BA(*) (5 mg/l), AIA (*) (2 mg/l) et agar Difco (7 g/l).

Entre trois et cinq semaines après la mise en culture, on a compté 11 cotylédons sur 20 ayant bourgeonné. On a fragmenté en quatre chacun des cotylédons en régénération et les fragments ont été placés sur le milieu mentionné ci-dessus. Environ dix jours après la fragmentation, on a repiqué 24 bourgeons par cotylé-

(*) BA : benzylamino-purine.
AIA : acide β indole acétique.

don sur un milieu solide sans hormone pour l'induction de racines; les plantules obtenues ont été transférées en serre.

Il faut donc environ 30 jours pour individualiser des bourgeons sur les cotylédons.

2.2. — *Régénération à partir de colonies provenant de protoplastes isolés de cotylédons* (Voie 1).

On a prélevé aseptiquement les cotylédons de 20 plantules hybrides, à partir desquels des protoplastes ont été isolés. Les étapes les plus importantes de la méthode d'isolement sont les suivantes :

1) *Macération enzymatique.* Afin d'obtenir la meilleure digestion possible des parois pectocellulosiques, les cotylédons sont « brossés » légèrement avec un pinceau et une poudre abrasive, le carborundum, puis rincés à l'eau distillée stérile avant d'être placés dans le milieu de macération. Sa composition est la suivante : eau, mannitol 0,45 M, Ca Cl_2 0,01 M, cellulase 0,6 p. 100 et macérozyme 0,3 p. 100. Le mélange enzymatique est ajusté au pH 5,6. La durée de la macération est d'environ 16 heures. Les 40 cotylédons ont été mis à digérer individuellement dans des tubes, à 25 °C, sans agitation.

2) *Purification par « flottation ».* A la fin de la macération, on remplace le mélange enzymatique par le milieu de rinçage contenant dans l'eau, saccharose 0,45 M et Ca Cl_2 0,01 M. Après une dissociation mécanique ménagée, on laisse au repos la suspension composée de protoplastes et de débris cellulaires. Les solutions contenant chacune les protoplastes d'un seul cotylédon sont trop diluées pour donner lieu à la multiplication cellulaire; on a donc ajouté une solution de protoplastes d'un mutant cytoplasmique albinos stable, avant la purification, servant d'entraîneurs et, ultérieurement, de nourrices. Les protoplastes montent dans la solution de saccharose et forment une zone sous une couche de mannitol 0,45 M (+ Ca Cl_2 0,01 M) préalablement déposée à la pipette, dans les tubes, à la surface de la suspension.

Pour évaluer le risque de fusion entre les protoplastes albinos et les protoplastes des cotylédons, on a cultivé aussi ces protoplastes blancs en mélange avec d'autres protoplastes albinos géniques, sans et avec traitement de fusion. Il n'y a eu complémentation que dans un cas et après traitement. La fréquence de fusion spontanée entre protoplastes de feuilles différentes est donc très inférieure ($< 10^{-5}$) à la fréquence de colonies vertes dans les cultures en mélange (de l'ordre de 10^{-2}).

3) *Culture des protoplastes en milieu liquide.* On remplace la solution de sucre par le milieu de culture. L'inoculum liquide est étalé en boîtes de Pétri. La composition du milieu est la suivante : macroéléments dilués deux fois et microéléments de MURASHIGE et SKOOG, vitamines B, acide folique (50 mg /l), BA (2 mg /l), ANA (*) (1 mg /l), glutamine (200 mg /l), inositol (100 mg /l), mannitol (76 g /l) et saccharose (10 g /l).

Les protoplastes de 29 cotylédons sur 40 se sont divisés et ont poussé activement pour former des colonies vertes reconnaissables au bout de deux mois de culture environ. Ces colonies ont été repiquées sur un milieu solide contenant BA à 0,5 mg /l et AIA à 0,2 mg /l. Les colonies ont commencé à bourgeonner au bout

(*) ANA : acide naphtalène acétique.

d'environ trois semaines; *deux bourgeons par colonie* ont été repiqués sur le milieu MS normal solide sans substance de croissance pour l'induction de racines. *Deux plantules par colonie* ont ensuite été transférées en serre. Le nombre de colonies régénérées est variable d'un cotylédon à l'autre, le nombre minimum étant de six colonies et le nombre maximum de 50 colonies par cotylédon.

Il s'écoule environ 80 jours entre l'isolement des protoplastes et l'individualisation des bourgeons.

2.3. — *Régénération à partir de cultures de tissus induites sur des cotylédons et soumises à un nombre variable de passages* in vitro (Voies 2, 3 et 4 — fig. 1).

Des proliférations cellulaires très friables ont été induites sur neuf cotylédons, prélevés sur neuf plantules hybrides, par un milieu solide de MURASHIGE et SKOOG (MS : macro- et microéléments, vitamines B, saccharose à 30 g /l, glutamine à 200 mg /l et inositol à 100 mg /l), auquel on a ajouté de la kinétine (0,2 mg /l) et du 2,4-D (*) (2 mg /l). Dans ces conditions, pour la presque totalité des cellules cotylédonaires, il y a dédifférenciation et reprise du cycle cellulaire.

Les tissus obtenus, semblables à une « purée » de cellules ont été repiqués

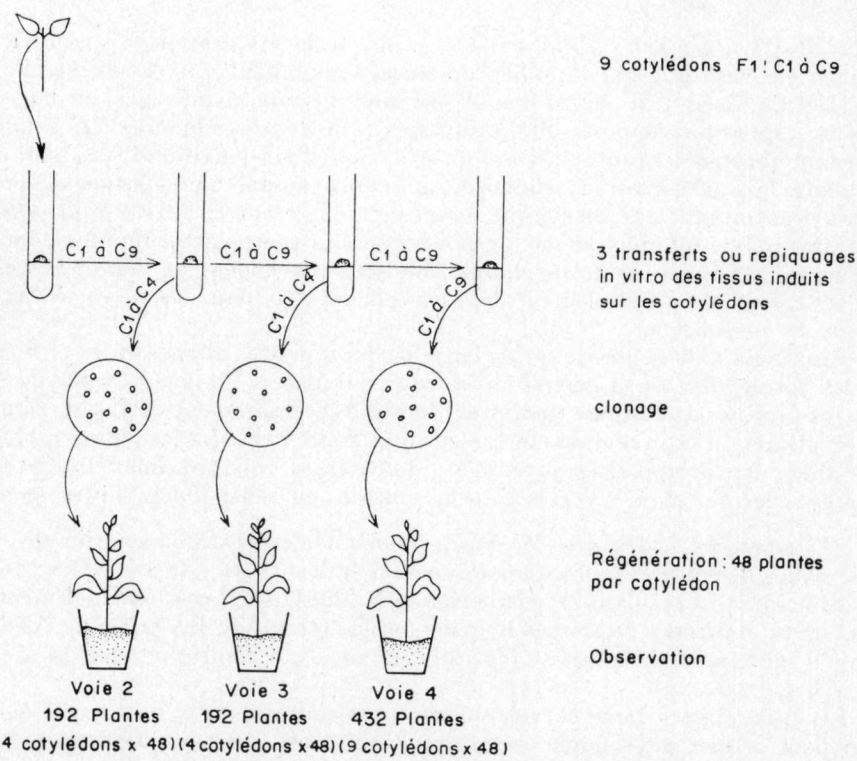


FIG. 1. — *Régénération à partir de cultures de tissus induites sur des cotylédons et soumises à un nombre variable de passages* in vitro (Voies 2, 3 et 4).

(*) 2,4-D : acide 2,4 — dichlorophénoxyacétique.

trois fois sur un milieu semblable. Au cours de ces transferts (ou voies de régénération comportant un nombre variable de passages sur milieu avec 2,4-D et appelées voies 2, 3 et 4), on a dissocié en milieu liquide une fraction représentative de ces tissus. Des suspensions constituées presqu'uniquement de cellules séparées ont été obtenues par sédimentation différentielle et ces cellules ont été prélevées et étalées sur un milieu solide, en boîtes de Pétri. Ce milieu (MS avec glucose à 10 g /l, BA à 2 mg /l et AIA à 1 mg /l) permet le clonage et la synthèse de chlorophylle.

Les 48 premières colonies vertes par culture (cotylédon) ont été repiquées sur un milieu permettant la différenciation de bourgeons (MS normal solide avec BA à 5 mg /l et AIA à 2 mg /l); les bourgeons ont été placés sur un milieu solide sans substance de croissance pour l'induction de racines. Les plantules obtenues ont ensuite été transférées dans les conditions de culture horticole. On a régénéré 48 plantes par cotylédon de C_1 à C_4 pour les voies 2 et 3, et 48 plantes par cotylédon de C_1 à C_9 pour la voie 4.

Il s'est écoulé environ 135 jours entre la mise en culture des cotylédons et l'individualisation des bourgeons (voie 2), 180 jours lorsqu'on a effectué deux transferts (voie 3) et 255 jours lorsqu'on a effectué trois transferts (voie 4).

3. — *Méthodes d'observation des plantes régénérées*

3.1. — *Classement des variants.*

La caractérisation des variants a été faite au stade plantules (soit 5 feuilles développées après le repiquage en serre) sur la base des critères suivants :

1) les variants plus jaunes (J) que le type F_1 initial jaune-vert;

2) les variants vert clair (v);

3) les variants verts (V), parmi lesquels on distingue du vert « intermédiaire » et du vert « foncé »;

4) les variants instables (I. ch.). L'instabilité génétique est rendue perceptible par la présence des marqueurs a_1^+/a_1 yg^+/yg. Elle se manifeste par l'apparition fréquente, sur les feuilles, d'îlots cellulaires verts, jaune clair ou les deux couleurs jumelées;

5) les variants morphologiques (V.m) dont la forme ou la taille des feuilles est nettement modifiée, sans changement de couleur.

Les classes sont mutuellement exclusives.

3.2. — *Analyse génétique des variants verts.*

On a croisé chaque variant, en l'utilisant comme femelle, avec chacune des lignées parentales (homozygotes pour a_1 et yg, respectivement). De plus, on a fait des autofécondations. Les ségrégeants portant sur la couleur des cotylédons ont été comptés en boîtes de Pétri; les semis ont été faits sur milieu minéral avec agar.

Compte tenu des génotypes obtenus dans les descendances des croisements-tests, on a cinq gamètes différents à tester et les ségrégations s'interprètent comme suit :

Gamètes testés / Gamètes testeurs	$a_1^+\ yg^+$	$a_1^+\ yg$	$a_1\ yg^+$	$a_1^0\ yg^+$	$a_1^0\ yg$
$a_1\ yg^+$	Vert clair v	Jaune-vert J^1	Jaune J^2	Jaune-vert J^{1-2}	Jaune clair J
$a_1^+\ yg$	Vert intermédiaire V	Vert clair v	Jaune-vert J^1	Vert intermédiaire V	Jaune-vert J^1

Par exemple, le génotype $a_1^+/a_1^0\ yg^+/yg$ forme quatre gamètes : $a_1^+yg^+$, a_1^+yg, $a_1^0yg^+$ et a_1^0yg. Sa ségrégation, après le croisement-test avec la lignée parentale $a_1/a_1\ yg^+/yg^+$ sera 1 v : 1 J^1 : 1 J^{1-2} : 1 J, soit un vert clair : deux jaune-vert : un jaune clair.

3.3. — *Estimation de la fertilité pollinique.*

A la floraison, on a estimé la fertilité pollinique de 258 plantes variantes et de 110 plantes non variantes. D'après la taille des fleurs et des capsules résultant d'autofécondation, elles ont été classées en fertiles, demi-stériles et stériles.

Afin de vérifier qu'il y a bien corrélation entre la taille d'une fleur et son niveau de fertilité pollinique, on a estimé la fertilité pollinique de quelques fleurs de types différents en faisant la coloration-test des grains de pollen par la solution d'Alexander (1969). La distinction entre les grains avortés et normaux est basée sur la coloration rouge du cytoplasme pollinique lorsqu'il est vivant, alors que la paroi seule est colorée en vert lorsqu'il y a dégénérescence.

3.4. — *Numération chromosomique.*

La numération chromosomique a été faite sur un échantillon de chaque classe de variants et sur des plantes non variantes, par l'examen de préparations mitotiques réalisées à partir de jeunes extrémités radiculaires.

Les étapes successives les plus importantes de la méthode utilisée pour les racines de Tabac sont les suivantes :

- Prétraitement des extrémités radiculaires dans une solution aqueuse saturée d'α-bromonaphtalène pendant 90 mn et fixation dans l'alcool acétique 3:1;
- Hydrolyse dans l'HCl à 60 °C pendant 1 mn;

- Coloration par la rosaniline, un des composants de la fuchsine basique, durant 20 mn;
- Digestion enzymatique dans une solution aqueuse de pectinase à 5 p. 100 pendant 50 mn;
- Écrasement de l'extrémité radiculaire colorée entre lame et lamelle, dans une goutte d'acide acétique à 45 p. 100.

4. — *Méthodes statistiques*

On a utilisé les tests statistiques suivants :

1) le chi-carré pour tester :

- la conformité d'une distribution observée avec une distribution théorique donnée (dans le cas de la comparaison entre les ségrégations observées pour les variants verts et les ségrégations attendues d'après l'hypothèse mendélienne), et
- l'homogénéité de plusieurs distributions observées.

2) le z pour tester certaines hypothèses relatives à des proportions. Ce test peut être uni- ou bilatéral.

Résultats

1. — *Spectres de variations*

1.1. — *Plantes régénérées directement à partir de cotylédons* (V_0).

Bien que présentant des effectifs relativement faibles, presque toutes les classes de variants sont représentées (tabl. 1).

La distribution des classes de variants par cotylédon (tabl. 2) montre que, à l'exception d'un cotylédon présentant deux variants pour l'instabilité génétique portant sur le caractère chlorophyllien, les variants sont présents en un seul exemplaire par culture (cotylédon). L'effectif trop faible, en nombre de cultures indépendantes (11) et en nombre de plantes régénérées par culture, ne permet pas de tester l'homogénéité de cette répartition. Toutefois, un effectif trois fois plus grand en nombre de plantes régénérées a donné, au cours d'une expérience ultérieure, des fréquences de variants du même ordre de grandeur que celles de V_0.

Cependant, du fait que (1) les bourgeons ont une organisation synchrone sur le tissu cotylédonaire et (2) ils sont homogènes pour les variations, sauf un cas de chimère, on peut admettre que la plupart des bourgeons néoformés l'un à côté de l'autre représentent chacun au plus une cellule du cotylédon. On peut alors estimer la variabilité intercellulaire des cotylédons par le taux de plantes variantes (tabl. 5.*a* à 5.*d*). Cette variabilité peut être préexistante et avoir été exprimée par la reprise de la différenciation, ou avoir été provoquée dans les cellules mères des bourgeons lors du processus de dédifférenciation.

TABLEAU I

Spectres de variations en fonction des méthodes de régénération de plantes à partir de cotylédons

Numéros des voies de régénération / Classes de variants	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4	Total	Chi-carré d'homogénéité pour les variants verts de type V (2 d.l.) Colonnes V_2, V_3 et V_4	Chi-carré d'homogénéité pour les variants verts de type V (4 d.l.) Colonnes V_0 à V_4
J	1	18	10	10	19	58		
v	1	17	4	3	21	46		
V	3	22	7	0	21	53	9,51 (**)	14,24 (**)
I.ch.	2	19	12	31	59	123		
V.m.	0	62	12	31	57	162		
Non variants	248	457	147	117	255	1 224		
Nombre total de plantes régénérées	255	595	192	192	432	1 666		
Nombre de cultures indépendantes	11	29	4	4	9			

Chi-carré d'homogénéité pour le spectre de variations par repiquage (Colonnes V_2, V_3 et V_4) : 38,55(**) (10 d.l.)

Chi-carré d'homogénéité global (Colonnes V_0 à V_4) : 189,54(**) (20 d.l.)

J : jaunes; v : vert clair; V : verts; I. ch. : instables chlorophylliens; V.m. : variants morphologiques.

TABLEAU 2

Distribution des classes de variants par cotylédon ou culture
((Régénération directe, V_0 — Nombre de cultures indépendantes : 11)

x_i	f_i(J)	f_i(v)	f_i(V)	f_i(I.ch.)	f_i(V.m.)
0	10	10	8	10	11
1	1	1	3	0	0
2	0	0	0	1	0

x_i : nombre de variants d'un type donné observé par culture (cotylédon).
f_i : nombre de cultures (cotylédons) présentant x_i variants d'un type donné.

1.2. — *Plantes régénérées à partir de colonies provenant de protoplastes isolés de cotylédons* (V_1).

Sur un effectif de cultures indépendantes trois fois plus grand (29) et sur deux fois plus de plantes régénérées que pour l'expérience V_0, les fréquences de variants sont plus élevées dans toutes les classes (tabl. 1).

De plus, entre les cotylédons provenant du même embryon, on trouve quelquefois une hétérogénéité significative dans la répartition des classes de variants. Ceci présume d'une hétérogénéité globale entre les cotylédons.

Deux plantes ont été régénérées par colonie. Chaque fois qu'une variation jaune (J), vert clair (v) ou verte (V) a été observée, elle intéressait les deux plantes issues de la même colonie. Puisque les colonies dérivent chacune d'un protoplaste isolé, on peut en conclure que, dans la majorité des cas, il suffit d'une plante pour représenter la descendance d'une colonie.

Si l'on considère chaque cotylédon comme une sous-culture, on peut chercher à appliquer le test de fluctuation (LURIA et DELBRÜCK, 1943). En effet, si l'on fragmente l'expérience en sous-cultures et si l'on trouve, pour la distribution du nombre de variants dans les sous-cultures, une variance nettement plus grande que la moyenne, c'est qu'il existe une probabilité élevée que les variants soient en partie antérieurs à l'établissement de ces sous-cultures.

Le tableau 3 montre la distribution des classes de variants par sous-culture (cotylédon), c'est-à-dire le nombre de variants d'un type donné observé par sous-culture (x_i) et le nombre de sous-cultures présentant x_i variants d'un type donné (f_i).

Aucune distribution n'est significativement différente d'une distribution de type Poisson. On peut donc penser que les variants sont présents ou induits, au plus tôt, dans les cellules différenciées du cotylédon. Le seul cas d'antériorité pourrait être celui d'une sous-culture contenant quatre colonies portant la même variation vert clair, ce qui fait approcher le test de son seuil de signification.

La moyenne par sous-culture et la variance sont nettement plus élevées dans le cas des variants morphologiques. Bien qu'ils constituent un groupement de formes donc d'origines diverses, on peut penser qu'ils sont sans doute présents très tôt lors de la dédifférenciation et lors de la phase « colonie ».

TABLEAU 3

Distribution des classes de variants par cotylédon ou culture
(Régénération à partir de colonies provenant de protoplastes isolés de cotylédons, V_1
Nombre de cultures indépendantes : 29)

x_i	f_i(J)	f_i(v)	f_i(V)	f_i(I.ch.)	f_i(V.m.)
0	12	17	14	14	2
1	16	9	10	11	10
2	1	2	3	4	7
3	0	0	2	0	6
4	0	1	0	0	1
5	0	0	0	0	2
6	0	0	0	0	1

Test de Fluctuation (LURIA and DELBRÜCK, 1943)

	J	v	V	I.ch.	V.m.
Moyenne par culture($\bar{x}$)	0,62	0,59	0,76	0,66	2,14
Somme des carrés (S.C.)	8,83	23,03	23,31	14,55	61,45
Carré moyen (C.M.) . .	0,32	0,82	0,83	0,52	2,19
Chi-carré 28 d.l. (S.C./$\bar{x}$)	14,24 NS	39,03 NS	30,67 NS	22,05 NS	28,71 NS
Probabilité	0,98	0,10	0,30	0,75	0,45

La distribution des variants jaunes (J) est proche de la distribution de Poisson. Ils sont donc, au plus tôt, contemporains de la mise en culture. On peut faire le même raisonnement au sujet des instables chlorophylliens (I. ch.).

1.3. — *Plantes régénérées à partir de cultures de tissus induites sur des cotylédons* (V_2, V_3 et V_4).

Puisqu'il peut y avoir un effet de l'origine (culture ou cotylédon) et un effet du nombre de repiquages sous forme indifférenciée (voies de régénération 2, 3 et 4), on a groupé les résultats selon les origines et selon les repiquages.

1.3.1. — *Spectre global de variations par origine cotylédonaire* (voies de régénération cumulées).

Le tableau 4 montre qu'il y a une hétérogénéité significative dans la répartition des classes de variants entre les cotylédons. En particulier, la répartition des variants verts de type V est hétérogène.

1.3.2. — *Spectre global de variations par repiquage* (cotylédons cumulés).

Le test établi sur les colonnes V_2, V_3 et V_4 du tableau 1 montre qu'il y a, à nouveau, une hétérogénéité de répartition. Celle-ci reste particulièrement visible au niveau des variants verts de type V.

TABLEAU 4

Spectre global de variations par origine cotylédonaire
(Voies de régénération cumulées : $V_2 + V_3 + V_4$)

Classes de variants \ Numéros des cotylédons	C_1	C_2	C_3	C_4	Total	Chi-carré d'homogénéité pour les variants verts de type V (3 d.l.)
J	8	8	8	8	32	
v	2	6	1	4	13	
V	4	3	0	18	25	32,24 (**)
I. ch.	21	21	18	19	79	
V.m.	18	35	6	15	74	
Non variants	91	71	111	80	353	
TOTAL	144	144	144	144	576	

Chi-carré d'homogénéité global (Colonnes C_1 à C_4) : 69,65** (15 d.l.).

Remarque : Le nombre de variants verts (V et v) est sous-estimé. En effet, on en compte 56 au stade plantules alors que l'analyse génétique, effectuée avec des plantes adultes, révèle 70 variants verts. Cette différence s'explique ainsi : au cours des observations portant sur les plantules, on a classé parmi les « non variants » 14 plantules dont le phénotype jaune-vert paraissait un peu plus vert que la normale. Il s'agissait en fait de neuf vert clair (v) et cinq vert intermédiaire (V).

2. — *Évolution des fréquences des variants de* V_0 *à* V_4.

Du fait de l'hétérogénéité de répartition globale des variants d'une part entre les expériences et, d'autre part, entre les origines cotylédonaires, on est conduit à analyser l'évolution des fréquences globales de chaque classe de variants depuis

TABLEAU 5.*a*

Évolution des fréquences des variants jaunes de V_0 *à* V_4

	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4
Nombre de variants	1	18	10	10	19
Nombre total de plantes régénérées.	255	595	192	192	432
Fréquence	$0{,}39 \cdot 10^{-2}$	$3{,}0 \cdot 10^{-2}$	$5{,}2 \cdot 10^{-2}$	$5{,}2 \cdot 10^{-2}$	$4{,}4 \cdot 10^{-2}$

Comparaisons
V_0 *VS* V_1 : $z = 2{,}38$*
V_1 *VS* V_2 : $z = 1{,}42$ NS.
V_3 *VS* V_4 : $z = 0{,}444$ NS.

TABLEAU 5.*b*

Évolution des fréquences des variants verts (V et v) de V_0 à V_4

	Cellules vertes préexistantes (Feuilles)	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4
Nombre de cellules vertes	4 462					
Nombre de variants		4	39	11	3	42
Nombre total de cellules	19 311 378					
Nombre total de plantes régénérées		255	595	192	192	432
Fréquence	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	$1{,}6 \cdot 10^{-2}$	$6{,}6 \cdot 10^{-2}$	$5{,}7 \cdot 10^{-2}$	$1{,}6 \cdot 10^{-2}$	$9{,}7 \cdot 10^{-2}$

Comparaisons :
V_0 *VS* V_1 : $z = 3{,}04$**
V_0 *VS* V_4 : $z = 4{,}13$**
V_1 *VS* V_4 : $z = 1{,}86$ NS
V_3 *VS* V_4 : $z = 3{,}64$**

TABLEAU 5.*c*

Évolution des fréquences des variants pour l'instabilité génétique portant sur le caractère chlorophyllien (comprenant les mutations « chloroplastiques ») de V_0 *à* V_4

	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4
Nombre de variants	2	19	12	31	59
Nombre total de plantes régénérées	255	595	192	192	432
Fréquence	$7{,}84 \cdot 10^{-3}$	$31{,}9 \cdot 10^{-3}$	$62{,}5 \cdot 10^{-3}$	$161{,}4 \cdot 10^{-3}$	$136{,}6 \cdot 10^{-3}$

Comparaisons :
V_0 *VS* V_1 : $z = 2{,}07$*
V_1 *VS* V_2 : $z = 1{,}89$ NS
V_2 *VS* V_3 : $z = 3{,}07$**
V_3 *VS* V_4 : $z = 0{,}817$ NS

V_0 jusqu'à V_4 et la distribution de chaque classe de variants par origine cotylédonaire. Les tableaux 5.*a*, 5.*b*, 5.*c* et 5.*d* reprennent les données du tableau 1 par classe de variants depuis V_0 jusqu'à V_4. Les tableaux 2, 3 et 6 présentent les distributions de chaque classe de variants par origine cotylédonaire pour les expériences V_0, V_1 et V_4 respectivement.

2.1. — *Variants jaunes* (J).

Les variants jaunes (tabl. 5.*a*) ont une fréquence de l'ordre de 10^{-2} depuis V_0 jusqu'à V_4. Une seule différence significative peut être observée : la fréquence en V_1 est plus élevée qu'en V_0. Il y a une stabilisation ensuite.

TABLEAU 5.*d*

Évolution des fréquences des variants morphologiques de V_0 à V_4

	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4
Nombre de variants	0	62	12	31	57
Nombre total de plantes régénérées.	255	595	192	192	432
Fréquence	0	$104{,}2 \cdot 10^{-3}$	$62{,}5 \cdot 10^{-3}$	$161{,}5 \cdot 10^{-3}$	$131{,}9 \cdot 10^{-3}$

Comparaisons
V_0 *VS* V_1 : $z = 5{,}35$**
V_1 *VS* V_2 : $z = 1{,}72$ NS
V_2 *VS* V_3 : $z = 3{,}07$**
V_3 *VS* V_4 : $z = 0{,}978$ NS

TABLEAU 6

Répartition des cotylédons par classe de variants
(Régénération après induction de cultures de tissus sur des cotylédons, V_4
Nombre de cultures indépendantes : 9)

x_i	fi(J)	fi(v)	fi(V)	fi(I.ch.)	fi(V.m.)
0	2	3	5	0	0
1	1	2	1	0	0
2	3	0	2	1	0
3	1	2	0	1	1
4	1	0	0	0	2
5	1	1	0	1	1
6	0	0	0	1	1
7	0	0	0	1	2
8	0	1	0	2	1
9	0	0	0	1	0
.					
11	0	0	0	1	0
.					
13	0	0	0	0	1
.					
16	0	0	1	0	0

Test de fluctuation (LURIA and DELBRÜCK, 1943)

	J	v	V	I.ch.	V.m.
Moyenne par culture ($\bar{x}$)	2,11	2,33	2,33	6,56	6,33
Somme des carrés (S.C.)	22,89	60,00	216,00	66,22	72,00
Carré moyen (C.M.)	2,86	7,50	27,00	8,28	9,00
Chi-carré 8 d.l. (S.C./$\bar{x}$)	10,85 NS	25,75**	92,70**	10,09 NS	11,37 NS
Probabilité . . .	0,3	$< 0{,}005$	~ 0	0,3	0,2

La distribution des variants jaunes par cotylédon n'est jamais différente d'une distribution de Poisson [tabl. 2, 3 et 6 — colonne f (J)].

Ces trois constatations : (1) haute fréquence, (2) non accumulation et (3) distribution de type Poisson, faites dans chaque expérience conduisent à conclure à un pic de fréquence relativement élevé dès le départ de chaque culture.

2.2. — *Variants verts* (V *et* v).

De V_0 à V_4, les variants verts (tabl. 5.*b*) sont en fréquence du même ordre 10^{-2}). Il y a cependant des différences significatives. Ainsi, les expériences V_0 et V_3 présentent des fréquences plus faibles que celles obtenues dans V_1, V_2 et V_4.

Dans l'expérience V_4 [tabl. 6 — colonnes f_i(v) et f_i (V)], les distributions des variants verts v et V par cotylédon sont significativement différentes d'une distribution de type Poisson. Dans l'expérience V_1 [tabl. 3 — colonnes f_i(v) et f_i (V)], les distributions non significativement différentes de celle de Poisson présentent déjà une tendance à accumuler plusieurs variants dans un seul cotylédon.

Les trois constatations suivantes : (1) haute fréquence, (2) stabilité de la fréquence et (3) accumulation dans certaines cultures en V_4, conduisent à conclure à (1) l'antériorité possible de quelques variants par rapport au départ de la culture, (2) un pic de fréquence élevé dès le départ de la culture, (3) un effet non inducteur des conditions ultérieures de culture multipliant seulement les variants présents au départ.

L'estimation réalisée, par ailleurs, sur feuilles *in situ* (DULIEU et DALEBROUX, 1975) donne un ordre de fréquence 100 fois plus faible que celui observé de V_0 à V_4. On peut donc penser que la dédifférenciation des cellules chlorophylliennes et leur reprise d'activité de division est un facteur de variations plus important que la multiplication cellulaire *in vitro* en tant que telle.

Pour ces variants verts et jaunes, le problème est donc de préciser s'ils préexistent, sous forme potentielle, à la mise en culture ou s'ils sont induits au cours de la dédifférenciation.

2.3. — *Variants pour l'instabilité génétique portant sur le caractère chlorophyllien* (I. ch.).

La fréquence de ces variants double entre V_1 et V_2 et fait plus que doubler entre V_2 et V_3. Le tableau 5.*c* montre clairement, dès le premier repiquage (V_2), l'effet de la multiplication *in vitro* sous forme indifférenciée sur l'apparition de types instables, par rapport à la régénération rapide des cellules. Il est possible qu'un état d'équilibre soit atteint assez rapidement.

Leur distribution assez homogène dans les tableaux 3 et 6 est conforme avec cette constatation : en V_4, il y a des instables chlorophylliens dans toutes les cultures alors qu'il y en a seulement dans la moitié d'entre elles en V_1. Il semble donc que les conditions de la multiplication *in vitro* soient prédominantes pour déterminer les variations portant sur l'instabilité.

2.4. — *Variants morphologiques* (V.m.).

Le tableau 5.*d*, concernant les variants morphologiques dont la nature est certainement très diverse, montre l'effet immédiat de la multiplication *in vitro*.

3. — *Analyse génétique des variants verts* (V *et* v)

La fréquence de variations vertes est très élevée puisqu'elle atteint 6,6 p. 100 des plantes régénérées dans l'expérience V_1 et 8,6 p. 100 dans l'expérience V_{2+3+4}. Une étude de la nature génétique de ces variants a été entreprise. Le test génétique a été fait sur des plantes adultes.

Sur les 133 variants verts étudiés, on a observé trois degrés de coloration verte, correspondant à trois groupes de génotypes différents :

(1) les « vert foncé » possèdent trois ou quatre gènes sauvages sans antagoniste de type a_1 ou *yg* (observés uniquement dans V_{2+3+4}),

(2) les « vert intermédiaire » possèdent deux ou trois gènes sauvages et un antagoniste faible (*yg*),

(3) les « vert clair » possèdent trois gènes sauvages et un antagoniste fort (a_1).

L'apparition de ces génotypes résulte d'événements simples (délétions; réversions à l'état homozygote d'un locus) ou doubles (deux réversions à l'état homozygote; une délétion et une réversion à l'état homozygote). La nature des événements conduisant à une réversion à l'état homozygote d'un locus (crossing-over somatique, translocation entre homéologues ou conversion) ne peut être précisée puisque l'on ne dispose pas de la colonie cellulaire sœur éventuellement formée au cours de la ségrégation somatique du tissu variant.

Le nombre de plantes mutées au locus a_1 seulement est égal à 53; le nombre de plantes mutées au locus *yg* seulement est égal à 55; le nombre de plantes mutées aux deux loci est égal à 5. Le nombre total de plantes observées est égal à 1 666 (tabl. 1, colonnes V_0 à V_4). On peut, dans ces conditions, tester l'indépendance entre les deux loci du point de vue mutation : la valeur z obtenue est égale à 2.015, ce qui oblige à rejeter l'hypothèse d'indépendance.

Les tableaux 7.*a*, 7.*b* et 7.*c* donnent les résultats globaux de l'autofécondation et du croisement avec les lignées parentales, pour chaque groupe génotypique, dans les expériences V_0, V_1 et V_{2+3+4} respectivement.

Il existe fréquemment un biais, pouvant parfois être significatif, en défaveur du ségrégeant le plus déficient (lignes 2 et 3; lignes 9 et 10 du tableau 7.*b*; lignes 14 et 15 du tabl. 7.*c*). Ce biais ne peut être dû à une mauvaise transmission du chromosome modifié, celui-ci étant également réparti dans les gamètes testés. Dans la mesure où le biais n'est pas toujours observé, il pourrait résulter d'une moins bonne germination des génotypes les plus déficients, autrement dit d'une élimination partielle post /zygotique.

4. — *Fertilité pollinique des plantes régénérées de cultures de tissus*

La répartition des caractères de fertilité pollinique ne dépend pas du matériel d'origine (tabl. 8.*a*). Il n'y a aucune différence entre les cotylédons que nous avons comparés (répartition homogène).

Par contre, la durée de la culture *in vitro* a une influence significative sur le nombre de plantes fertiles et stériles (tabl. 8.*b*).

On peut donc estimer que les conditions de la culture *in vitro* entraînent l'apparition de la stérilité pollinique.

TABLEAU 7.*a*

Résultats globaux de l'autofécondation et du croisement avec les lignées parentales pour chaque groupe génotypique. Régénération directe, V_0.

Groupes génotypiques	Tests génétiques	Classes de ségrégeants V	v	J^1	J^2	J	Hypothèse	χ^2	Conclusion sur le génotype	Evénement
Vert intermédiaire type 1	A.F.	404	124	—	—	—	3 : 1	0,646 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^+}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple
Effectif : 2	x a_1	—	76	78	—	—	1 : 1	0,026 NS		
	x yg	92	98	—	—	—	1 : 1	0,189 NS		
Vert intermédiaire type 2	A.F.	78	7	16	17	—	10 : 1 : 2 : 2	0,208 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^0}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple (délétion)
Effectif : 1	x a_1	—	55	103	—	38	1 : 2 : 1	3,46 NS		
	x yg	52	24	27	—	—	2 : 1 : 1	0,185 NS		
Vert clair	A.F.	25	42	—	22	—	1 : 2 : 1	0,483 NS	$\frac{a_1^+}{a_1}\ \frac{yg^+}{yg^+}$	simple
Effectif : 1	x a_1	—	45	—	37	—	1 : 1	0,780 NS		
	x yg	48	—	45	—	—	1 : 1	0,097 NS		

V : vert intermédiaire; v : vert clair; J^1 : jaune-vert; J^2 : jaune; J : jaune clair.

TABLEAU 7.*b*

Résultats globaux de l'autofécondation et du croisement avec les lignées parentales pour chaque groupe génotypique. Régénération à partir de colonies provenant de protoplastes isolés de cotylédons, V_1.

Groupes génotypiques	Tests génétiques	Classes de ségrégeants V	v	J^1	J^2	J	Hypothèse	χ^2	Conclusion sur le génotype	Evénement
Vert intermédiaire type 1	A.F.	2 996	961	—	—	—	3 : 1	1,08 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^+}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple
Effectif : 32	x a_1	—	2 897	2 857	—	—	1 : 1	0,278 NS		
	x yg	2 870	2740	—	—	—	1 : 1	3,01 NS		
Vert intermédiaire type 2	A.F.	275	34	71	51	0	10 : 1 : 2 : 2	5,41 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^0}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple (délétion avec sélection contre a_1^0)
		76	9	39	34	8	10 : 1 : 2 : 2 : 1	32,7 **		
Effectif : 4	x a_1	—	228	430	—	167	1 : 2 : 1	10,5 **		
	x yg	330	169	135	—	—	2 : 1 :1	4,71 NS		
Vert clair	A.F.	778	1 515	—	626	—	1 : 2 : 1	20,1 **	$\frac{a_1^+}{a_1}\ \frac{yg^+}{yg^+}$	simple
Effectif : 23	x a_1	—	1 307	—	1 146	—	1 : 1	10,6 **		
	x yg	1 259	—	1 204	—	—	1 : 1	1,23 NS		

V : vert intermédiaire; v : vert clair; J^1 : jaune-vert; J^2 : jaune; J : jaune clair.

TABLEAU 7.c

Résultats globaux de l'autofécondation et du croisement avec les lignées parentales pour chaque groupe génotypique. Régénération après induction de cultures de tissus sur des cotylédons, V_{2+3+4}.

Groupes génotypiques	Tests génétiques	Classes de ségrégeants V	v	J^1	J^2	J	Hypothèse	x^2	Conclusion sur le génotype	Evénement
Vert foncé type 1	A.F.	100 %	—	—	—	—	—	—	$\frac{a_1^+}{a_1^+}\ \frac{yg^+}{yg^+}$	double
Effectif: 3	x a_1	—	100 %	—	—	—	—	—		
	x *yg*	100 %	—	—	—	—	—	—		
Vert foncé type 2	A.F.	100 %	—	—	—	—	—	—	$\frac{a_1^+}{a_1^0}\ \frac{yg^+}{yg^+}$	double (délétion avec sélection contre a_1^0)
Effectif : 2	x a_1	—	153	97	—	—	1 : 1	12.5 **		
	x yg	100 %	—	—	—	—	—	—		
Vert intermédiaire type 1	A.F.	1 287	436	—	—	—	3 : 1	0,085 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^+}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple
Effectif : 17	x a_1	—	954	1 034	—	—	1 : 1	3,22 NS		
	x*yg*	981	885	—	—	—	1 : 1	2,48 NS		
Vert intermédiaire type 2	A.F.	1 281	129	285	229	—	10 : 1 : 2 : 2	6,13 NS	$\frac{a_1^+}{a_1^0}\ \frac{yg^+}{yg}$	simple (délétion avec sélection contre a_1^0)
Effectif : 11	x a_1	—	511	1 057	—	331	1 : 2 : 1	58,46**		
	x *yg*	666	337	273	—	—	2 : 1 : 1	8,88*		
Vert clair	A.F.	1 557	3 100	—	1 451	—	1 : 2 : 1	5,06 NS	$\frac{a_1^+}{a_1}\ \frac{yg^+}{yg^+}$	simple
Effectif : 37	x a_1	—	2 186	—	2 095	—	1 : 1	1,93 NS		
	x *yg*	2 320	—	2 203	—	—	1 : 1	3,03 NS		

V : vert foncé et vert intermédiaire; v : vert clair, J^1 : jaune-vert; J^2 : jaune; J : jaune clair.

TABLEAU 8.*a*

Répartition des caractères de fertilité pollinique en fonction des origines cotylédonaires

	C_1	C_2	C_3	C_4	Total
F	29	31	26	27	113
S/2	11	12	4	22	49
S	12	8	13	13	46
TOTAL . .	52	51	43	62	208

Chi-carré d'homogénéité : 11,91 NS (6 d.l.).

TABLEAU 8.*b*

Répartition des caractères de fertilité pollinique en fonction du nombre de repiquages

	V_2	V_3	V_4	Total
F	26	27	142	195
S/2	4	15	62	81
S	2	6	84	92
TOTAL	32	48	288	368

Chi-carré d'homogénéité : 18,36** (4 d.l.).

TABLEAU 8.*c*

Répartition des caractères de fertilité pollinique en fonction des classes de variants

	J	v	V	I. ch. + V. m.	Non variants	Total
F	2	8	5	83	97	195
S/2	1	16	17	36	11	81
S	14	13	11	52	2	92
TOTAL	17	37	33	171	110	368

Chi-carré d'homogénété : 127,96** (8 d.l.).

Enfin, le tableau 8.*c* montre que la stérilité pollinique n'est pas répartie d'une manière homogène parmi les variants : 82 p. 100 de stérilité chez les variants de couleur contre 51 p. 100 chez les instables chlorophylliens et les variants morphologiques. Quant aux non variants, ils ne sont affectés de stérilité qu'à 12 p. 100.

Dans le premier cas, il s'agit vraisemblablement de stérilité gamétophytique, sans exclure la possibilité de cas de stérilité sporophytique. Dans l'état actuel, on ne peut préciser si la stérilité est concomitante des variations ou si elle s'y superpose ultérieurement.

5. — *Nombre chromosomique des plantes régénérées de cultures de tissus*

Le nombre chromosomique des variants (verts, instables chlorophylliens et variants morphologiques) est de 48 ou 96, à l'exception d'une plante à 46 chromosomes.

Le tableau 9.*a* montre la répartition des nombres diploïdes et tétraploïdes en fonction des classes de variants. D'après le test statistique, cette distribution est hétérogène à cause des fréquences dissymétriques des variants verts (v et V).

Par contre, la répartition paraît homogène en fonction des caractères de fertilité pollinique (tabl. 9.*b*).

La proportion de variants tétraploïdes, égale à 45 p. 100, n'augmente pas en fonction du nombre de repiquages *in vitro* (tabl. 9.*c*).

L'analyse génétique des variants verts de type v et de type V montre que toutes les ségrégations observées sont formées par des sporophytes diploïdes. Il

TABLEAU 9.*a*

Répartition des plantes diploïdes et tétraploïdes en fonction des classes de variants

	v	V	I. ch. + V. m.	Total
48 chromosomes . . .	14	25	14	53
96 chromosomes . . .	23	7	13	43
TOTAL	37	32	27	96

Chi-carré d'homogénéité : 11,43** (2 d.l.).

TABLEAU 9.*b*

Répartition des plantes diploïdes et tétraploïdes en fonction des caractères de fertilité pollinique

	F	S/2	S	Total
48 chromosomes . . .	9	21	23	53
96 chromosomes . . .	8	21	14	43
TOTAL	17	42	37	96

Chi-carré d'homogénéité : 1,22 NS (2 d.l.).

TABLEAU 9.*c*

Répartition des plantes diploïdes et tétraploïdes en fonction du nombre de repiquages

	V_2	V_3	V_4	Total
48 chromosomes . . .	6	2	45	53
96 chromosomes . . .	6	12	25	43
TOTAL	12	14	70	96

Chi-carré d'homogénéité : 11,95** (2 d.l.).

n'y a donc qu'une explication possible : les conditions de culture ont été peu inductrices de modifications du nombre chromosomique et ces doublements ont eu lieu indépendamment des variations classées dans le spectre et postérieurement à la régénération.

Discussion et conclusion

Les classes de variants observés ne recouvrent qu'une partie seulement des variations potentielles du génotype étudié. Cependant, elles peuvent être considérées comme représentatives du fait de la diversité de leurs causes génétiques : mutations chromosomiques, chloroplastiques, et probablement géniques.

Il est donc particulièrement intéressant de comparer les distributions et les fréquences de ces mêmes classes de variants en fonction des conditions de culture imposées aux cellules et en fonction des origines. Cette comparaison permet de montrer que les classes de variants ont des distributions assez caractéristiques qui reflètent leur mode d'apparition en conditions de culture et, sans doute, leur mode de multiplication dans la population cellulaire. Cependant, il est peu raisonnable de penser que l'effet du milieu, ou de l'un de ses composants, est direct car même les conditions de régénération rapide aboutissent à l'isolement de variants semblables. En effet, l'isolement de protoplastes suivi d'une courte phase de croissance indifférenciée entraîne le même type d'effets génétiques que l'entretien des souches cellulaires sur un milieu contenant notamment du 2,4-D à forte dose (2 mg /l). De plus, ces effets génétiques ont des fréquences très voisines comme le montre la comparaison des colonnes V_1 et V_2 du tableau 1. Les expériences de JANICK *et al.* (1977) vont dans le même sens. Les spectres de variations obtenus en régénérant directement des cellules différenciées en conditions horticoles sont très comparables à ceux obtenus après régénération de cultures *in vitro* dérivées de cellules dédifférenciées du même clone.

Il est probable que la régénération permet en fait la révélation d'une variabilité potentielle s'accumulant dans les cellules cotylédonaires au repos, sans exclure la possibilité que cette variabilité continue à s'accumuler dans les cellules en culture. Cette dernière possibilité n'a en fait qu'une importance très secondaire car le phénomène le plus caractéristique observé après l'obtention du spectre dans l'expérience V_1 est son maintien relativement stabilisé même après plusieurs repi-

quages sous forme indifférenciée (tissus assez friables). Cette stabilisation ne peut s'expliquer que par la tendance de la culture à évoluer vers un équilibre entre la production et le maintien des variants.

Les observations sur les distributions et les fréquences des variants de couleur, dont la nature génétique est connue, permettent de proposer l'interprétation suivante, qui peut à l'avenir être une hypothèse de travail. Les graines vieillissent en perdant peu à peu leur pouvoir germinatif. On sait que les cellules en phase de latence peuvent accumuler des mutations somatiques potentielles sous forme de cassures simples ou doubles des molécules de DNA (Blakeslee, 1954; Cheah et Osborne, 1978). Lors de la reprise du cycle cellulaire, ces cassures peuvent être réparées par plusieurs mécanismes, dont au moins un peut entraîner des variations par recombinaison post-replicative interchromatidique, ou n'être pas réparées et entraîner des délétions. Le même processus d'accumulation de mutations somatiques rend compte de la perte aléatoire de la totipotence parmi les cellules différenciées et parmi les cellules en culture (Murashige et Nakano, 1965).

On pourrait donc rechercher si, d'une part, le vieillissement a un effet sur la fréquence de cassures simples ou doubles du DNA et sur l'activité de réparation de ces cassures et si, d'autre part, cet effet est en corrélation avec les fréquences des variants (V et v).

Par ailleurs, le maintien d'une population cellulaire en régime de croissance exponentielle ou, au contraire, en croissance à phases alternées (latence — multiplication — saturation) peut sans doute influer sur les fréquences de mutations somatiques. Cet effet peut être indirect s'il résulte en réalité du vieillissement des cellules en phase de latence (stationnaire).

On peut donc résumer les conclusions sur les sources de la variabilité observée comme suit :

1) Une partie de la variabilité génétique est préexistante. Elle peut être déjà établie (îlots cellulaires variants) ou seulement potentielle (cassures non réparées au cours de la phase de latence qui suit le dernier cycle cellulaire). Elle sera révélée après la reprise du cycle cellulaire.

2) Une partie de la variabilité se met en place au cours de la multiplication *in vitro*, avec un effet maximum au début de la période de culture sous forme indifférenciée, suivi d'une relative stabilisation.

Les variants de couleur semblent dépendre du premier type de variabilité, les instables chlorophylliens et les variants morphologiques du second type.

D'un autre point de vue, l'étude de la nature génétique des variants verts, observés parmi les plantes régénérées de cultures de tissus induites sur les cotylédons, montre qu'il y a des événements doubles (deux réversions ou une délétion et une réversion) dont les fréquences ne sont pas compatibles avec l'hypothèse d'indépendance stochastique des événements. Dans ces conditions, si, comme dans les feuilles, la fréquence de cellules vertes est faible, on en déduit que la probabilité d'événements doubles est trop basse pour être observée. On pourrait donc envisager l'utilisation de cultures *in vitro* dans le but d'isoler somatiquement, à partir d'hybrides F_1 bien choisis, des formes nouvelles dont la fréquence d'apparition en descendance serait trop faible pour avoir la chance d'être isolées. Cette méthodologie permettrait de conserver l'effet hybride notamment dans le cas des plantes à multiplication végétative.

Les travaux réalisés sur la Laitue (Sibi, 1976) ont montré qu'à partir d'une variété améliorée et fixée, la régénération de cellules en culture *in vitro* permet de révéler une variabilité n'entraînant aucune ségrégation en autofécondation. L'ensemble des résultats discutés ici n'est pas contradictoire avec cette possibilité.

En effet, les très nombreux variants appelés morphologiques n'ont pas été étudiés en descendance. S'il existe des modifications caractérisées par une interaction nucléo-cytoplasmique variante, il faut sans doute les rechercher dans cette classe de variants morphologiques. Il existe cependant des mutations géniques homozygotes récessives chez les variants isolés de culture *in vitro* (DULIEU *et al.*, 1972); de même, on isole fréquemment chez les végétaux des mutations dominantes ou semi-dominantes. Dans ces cas, l'interaction nucléo-cytoplasmique est modifiée sous l'action du ou des gènes nucléaires mutés.

Reçu pour publication en octobre 1979.

Summary

Genetic changes observed on tobacco plants regenerated from cotyledons by in vitro *culture*

In order to assess the part of the pre-existing variability in the differentiated cells of cotyledons and that due to *in vitro* multiplication, buds were either directly regenerated from tobacco cotyledons (experiment V_0) or regenerated from cell colonies formed from protoplasts isolated from cotyledons (experiment V_1). Furthermore, friable cellular strains were obtained from cotyledons and transferred three times on medium maintaining nondifferentiated growth. A sample of these friable tissues was taken at each transfer and the fraction of isolated cells was cloned for regeneration (experiments V_2, V_3 and V_4).

The material used was an intervarietal hybrid of *Nicotiana tabacum* L., var. Xanthi n.c. × var. NC 95, carrying two marker loci, a_1^+/a_1 yg^+/yg, involved in chloroplast differentiation. The plantlets had greenish-yellow leaves; thus, it was easy to detect variations affecting colour and its stability.

Five groups of variant plantlets were observed : 1) yellow, 2) light green, 3) green, 4) greenish-yellow types showing a high frequency of variations and 5) morphological variants. The distribution of regenerated plants among these groups was used as a variation spectrum.

Crosses were made between the more or less green variants and the parental line (a_1^+/a_1^+ yg/yg, phenotypically yellow-green in NC 95 background and a_1/a_1 yg^+/yg^+ with partial chlorophyll deficiency in Xanthi n.c. background). These variants were classified into five different genotypes. The occurence of these genotypes resulted from single events (deletions or reversions) or double (two reversions or one deletion and one reversion). The frequencies of single and double events do not agree with the hypothesis of statistical independence.

Compared to the genetic stability observed in plant populations grown from seeds, the number of genetic changes was very high among regenerated plants. A proportion of these changes could either pre-exist in the differentiated cells or occur during dedifferentiation. It is likely that regeneration allows expression of potential variability accumulated in cotyledon resting cells after the last cell cycle; variability also accumulates in cultured cells.

Références bibliographiques

ALEXANDER M. P., 1969. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol.*, **44** (3), 117-122.

BLAKESLEE A. F., 1954. The aging of seeds and mutation rates. *Ann. New York Academy Sci.*, **57**, 488-490.

CHEAH K. S. E., OSBORNE D. J., 1978. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature*, **272**, 593-599.

DULIEU H. L., 1965. Réactions morphologiques des plantules de *Nicotiana tabacum* L. et de *Nicotiana glutinosa* L. au traitement des graines par le méthane sulfonate d'éthyle. Conséquences sur l'apparition de mutations chlorophylliennes somatiques. *Ann. Amélior. Plantes*, **15** (4), 359-372.

DULIEU H., DE BOELPAEPE R., DESHAYES A., 1971. Sur l'existence spontanée de recombinaisons somatiques chez un mutant de *Nicotiana tabacum* n. c. et leur induction par le rayonnement gamma; premières études génétiques. *C.R. Acad. Sc., Paris, Série D*, **272**, 3287-3290.

DULIEU H., VALLÉE J.-C., MARTIN C., 1972. Quelques effets de l'acide 4 amino 3.5.6 trichloropicoliuique (piclorame) sur les tissus de *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi n.c. en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sc., Paris, Série D*, **274**, 2574-2577.

DULIEU H., 1974. Somatic variations on a yellow mutant in *Nicotiana tabacum* L. ($a_1^+/a_1\ a_2^+/a_2$). I. Non reciprocal genetic events occurring in leaf cells. *Mutat. Res.*, **25**, 289-304.

DULIEU H., 1975. Somatic variations on a yellow mutant in *Nicotiana tobacum* L. ($a_1^+/a_1\ o_2^+/a_2$). II. Reciprocal genetic events occurring in leaf cells. *Mutat. Res.*, **28**, 69-77.

DULIEU H. L., DALEBROUX M. A., 1975. Spontaneous and induced reversion rates in a double heterozygous mutant of *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi n. c. — Dose-response relationship *Mutat. Res.*, **30**, 63-70.

JANICK J., SKIRVIN R. M., JANDERS R. B., 1977. Comparison of *in vitro* and *in vivo* tissue culture systems in scented geranium. *J. Hered.*, **68**, 62-64.

LURIA S. E., DELBRÜCK M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**, 491-511.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-496.

MURASHIGE T., NAKANO R., 1965. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. *Amer. J. Bot.*, **52** (8), 819-827.

SIBI Monique, 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. II. Aspect expérimental. Obtention de variants par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. Apparition de vigueur chez les croisements. *Ann. Amélior. Plantes*, **26**, 523-547.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre courant* pour les hauts de pages devra être fourni en 40 signes au maximum; — *le titre du mémoire;* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes); — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de...; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion et conclusion*; f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduits en anglais comportant une analyse *complète* de l'articie; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques*.

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivis (s) des initiales du (des) prénom (s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues menntionnées); le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.*; le volume; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; le nom de l'éditeur; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : M. RIVES, I.N.R.A., 11, rue Jean-Nicot 75007 Paris, France. On demande trois exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction à Mme MANDON, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, C.N.R.A., 78000 Versailles.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PÉRIODIQUES

TARIF DES ABONNEMENTS 1980	France Prix T.T.C.	Étranger Prix Net	LE NUMÉRO France Prix T.T.C.	LE NUMÉRO Étranger Frix Net
ANNALES AGRONOMIQUES, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 nos par an	275 F	303 F	84 F	84 F
ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DE GÉNÉTIQUE ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 nos par an	312 F	345 F	110 F	110 F
ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 nos par an	275 F	303 F	84 F	84 F
APIDOLOGIE	100 F	175 F (sauf RFA)	30 F	50 F (sauf RFA)
ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 6 nos par an				
ANNALES DE ZOOLOGIE, ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 nos par an				

* Les annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique deviennent : « Reproduction, Nutrition, Développement. »
** Les annales de Zoologie, Écologie animale cessent avec le n° 4, volume 11, 1979.
Les articles publiés dans cette série paraîtront désormais dans les *Œcologia Applicata* de la revue : *Acta Œcologica*.
Pour ces 2 revues, s'adresser à : C.D.R. Gauthier-Villars. B.P. 119, 93104 MONTREUIL CEDEX. Tél. (1) 374-12-45.

DERNIERS OUVRAGES PARUS

Industries agricoles et alimentaires.
170 p., 1980. . . . . 90,00 F

A quoi peut servir l'I.N.R.A.
82 fiches, 12 planches, 1980 . . . . . 40,00 F

Utilisation pour les ruminants des pâturages d'altitude et parcours méditerranéens. Xe Journées du Grenier de Theix.
576 p., 1979. . . . . 110,00 F

La Forêt et la Ville. Essai sur la forêt dans l'environnement urbain et industriel.
252 p., 1979. . . . . 50,00 F

Alimentation des ruminants. Principes de la nutrition et de l'alimentation des ruminants. Besoins alimentaires des animaux et valeur nutritive des aliments.
600 p., 1978. . . . . 140,00 F

Introduction à la statistique en biologie par **S. C. Pearce, traduction de J. P. Doazan.**
260 p., 1978. . . . . 25,00 F

L'I.N.R.A., l'eau et la production agricole.
270 p., 1978. . . . . 50,00 F

Génétique et Amélioration de la Vigne. Symposium international sur l'amélioration de la vigne. Bordeaux, 14-18 juin 1977.
472 p., 1978. . . . . 230,00 F

Pays, Paysans, Paysages dans les Vosges du Sud, par **le Groupe de Recherches I.N.R.A.-E.N.S.S.A.A.**
192 p., 1978. . . . . 55,00 F

Flore illustrée des Phanérogames de Guadeloupe et de la Martinique, par **J. Fournet.**
1652 p., 1978 . . . . . 300,00 F

Les Rongeurs de France, faunistique et biologie, par **H. Le Louarn et M. C. Saint-Girons.**
164 p., 1977. . . . . 80,00 F

La Vache laitière. IXe Journées du Grenier de Theix.
342 p., 1977. 60,00

Amélioration génétique des animaux de ferme. Application aux bovins (sous la direction de B. Vissac).
160 p., 1977. . . . . 35,00 F

Carte pédologique de la France à 1/1 000 000 par **J. Dupuis**. . . . . 96,00 F

Cartes pédologiques de France à 1/100 000.
(Vichy, Perpignan, Angoulême, Brives, Dijon, Toulon, Moulins, Condom, Tonnerre, Privas, St-Dié, Lesparre). 96,00 F chacune

Les demandes d'abonnements et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I.N.R.A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U.N.E.S.C.O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, (3) 229-344.

TABLE DES MATIÈRES

J. BELLIARD, E. NGUYEN VAN, J. PERNÈS. — Analyses des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle. I. Étude des parents et des hybrides de premières génération (F_1) entre un écotype de *Pennisetum mollissimum* Hochst (forme spontanée) et différentes formes cultivées de *Pennisetum americanum* (L.). Leeke 229

J. PERNÈS, E. NGUYEN VAN, M. BENINGA, J. BELLIARD. — Analyse des relations génétiques entre formes spontanées et cultivées chez le Mil à chandelle (*Pennisetum americanum* (L.), Leeke, P. *mollissimum* Hochst). II. — Étude de 3 familles F_2 issues d'hybrides entre une plante d'un écotype de *Pennisetum mollissimum* hochst et 3 lignées de Mil cultivé, *Pennisetum americanum* (L.), Leeke. 253

A. ABDELKEFI. — Technique d'étude en semi *in situ* des relations style- pollen chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.) 271

A. ABDELKEFI. — Analyse des paramètres de la fertilité en croisement *in vivo* et semi *in situ* chez la Luzerne (*Medicago sativa*) 285

S. ARCIONI, D. MARIOTTI, M. FALCINELLI, CECCARELLI S. — Relationship between ecological adaptation and carbohydrate reserve evolution for two different varieties of *Lolium perenne* L. (Relation entre l'adaptation écologique et l'évolution des réserves en hydrates de carbone de deux variétés de *Lolium perenne* L.) 309

Martine BARBIER, H. L. DULIEU. — Effets génétiques observés sur des plantes de Tabac régénérées à partir de cotylédons par culture *in vitro*. 321

CONTENTS

J. BELLIARD, E. NGUYEN VAN, J. PERNÈS. — Genetic analysis of the relationships between spontaneous and cultivated forms of Pearl millet. I. Study of the parents and F_1 generation obtained by crossing one ecotype of *Pennisetum mollissimum* Hochst (spontaneous form) and several cultivars of *Pennisetum americanum* (L.) Leeke 229

J. PERNÈS, E. NGUYEN VAN, M. BENINGA, J. BELLIARD. — Genetic analysis of the relationships between spontaneous and cultivated forms of Pearl millet. II. Study of 3 F_2 families from different F_1 hybrids P. *mollissimum* × P. *americanum* 253

A. ABDELKEFI. — A method for the study of the relationships between style and pollen grain in semi *in situ* in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). 271

A. ABDELKEFI. — Analysis of the fertility parameters in *in vivo* and semi *in situ* crossing in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) 285

S. ARCIONI, D. MARIOTTI, M. FALCINELLI, S. CECCARELLI. — Relationship between ecological adaptatation and carbohydrate reserve evolution for two different varieties of *Lolium perenne* L. 309

Martine BARBIER, H. L. DULIEU. — Genetic changes observed on Tobacco plants regenerated from cotyledons by *in vitro* culture 321

Les Annales de l'Amélioration des Plantes figurent dans Current Contents.

I.N. 10.036.029.5